

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Yves MANUEL

Première Thèse

LES PROTEINES du LIQUIDE CEPHALORACHIDIEN

Deuxième Thèse

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 8 Juillet 1965 devant la Commission d'Examen :

M. J. CHOPIN	Président
M ^{lle} D. GAUTHERON	} Examinateurs
M. G. BISERTE	

LYON

1965

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Yves MANUEL

Première Thèse

LES PROTEINES du LIQUIDE CEPHALORACHIDIEN

Deuxième Thèse

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

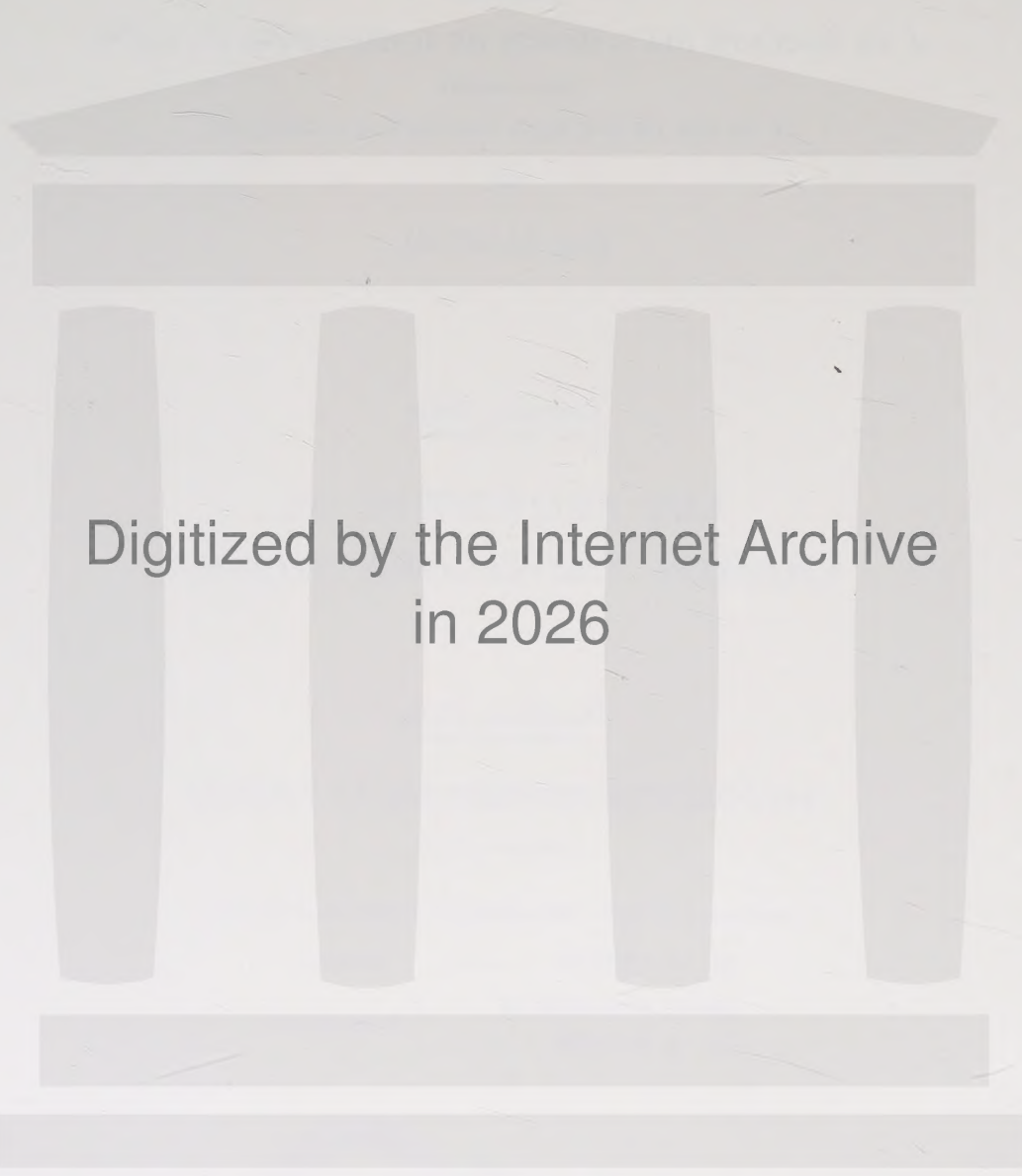
Soutenues le 8 Juillet 1965 devant la Commission d'Examen :

M. J. CHOPIN.....	Président
M ^{lle} D. GAUTHERON	} Examinateurs
M. G. BISERTE	

LYON

1965





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553409_0028

UNIVERSITE DE LYON - FACULTE DES SCIENCES

Doyens Honoraires

MM. LONGCHAMBON
DOUIN

MM. MOUSSA
GAUTHIER Henri

Professeurs Honoraires

MM. LOCQUIN
de LARAMBERGUE
SOLLAUD
MENTZER
MOUSSA

MM. JAFFARD
DOUIN
EYRAUD Henri
DEJARDIN
VIRET

Doyen

M. BRACONNIER

Assesseurs

MM. MESNARD
BOIDIN

Professeurs

MM. LONGCHAMBON, Minéralogie.
PRETTRE, Chimie industrielle.
COURTY, Chimie-Physique.
KUHNER, Botanique.
MALECOT, Mécanique rationnelle et appliquée.
PARIS, Chimie minérale.
AUMERAS, Chimie générale II.
COLONGE, Chimie organique.
JANIN, Physique générale.
FLANDRIN, Géologie appliquée.
BERNARD, Physique industrielle.
DUFAY Jean, Astronomie.
NIGON, Zoologie expérimentale.
GAUTHIER Henri, Géologie générale.
WAUTIER, Zoologie.
CHOPIN, Chimie Biologique.
CUEILLERON, Chimie.
BRACONNIER, Calcul différentiel et intégral.
EYRAUD Charles, Chimie-Physique appliquée.
SARAZIN, Physique nucléaire.

MM. BOIDIN, Microbiologie et Mycologie.
PERES, Physiologie.
MESNARD, Electronique.
GRANDMONTAGNE, Physique.
BOUTILLIER, Minéralogie.
LAFOUCRIERE, Physique nucléaire théorique.
DREUX, Chimie organique.
TEICHNER, Chimie industrielle.
PAVANS de CECCATTY, Zoologie.
MERLIN, Chimie analytique.
DUFAY Maurice, Physique de l'Atmosphère.
COHEN-ADAD, Chimie.
PHILBERT, Physique nucléaire.
COHEN-ADAD, Chimie.
DAVID Louis, Géologie générale.
CHANEL, Psychophysiologie.
MAURY, Méthodes Mathématiques de la Physique.
DEPRAZ, Physique nucléaire.
GAUTHIER Jean, Chimie.
GAUME, Physique expérimentale.

Professeurs sans Chaire

MM. FERON, Mathématiques.
LAFORGUE, Physique.
LEGAY, Zoologie expérimentale S.P.C.N.
UZAN, Physique S.P.C.N.
CHENEVOY, Géologie appliquée.
GINET, Zoologie.
ASCH, Physique.
MICHEL Pierre, Minéralogie.
DUCET, Biologie végétale.
Mlle. MAITROT, Physique.

MM. GEVIN, Géologie générale.
PONASSE, Mathématiques.
d'INCAN, Physique.
LEFEBVRE, Mathématiques.
PERNET, Mathématiques.
CHERY, Physique.
BERGEON, Physique C.S.U.
Mlle GAUTHERON, Chimie biologique.
DESCOTE, Chimie organique.
ERBEIA, Physique.
Mme ERICSON, Physique générale.
LEMOIGNE, Botanique.

Maîtres de Conférences

MM. MARTEL, Mécanique.
MATHIEU, Mécanique des Fluides.
PICARD Philippe, Mathématiques.
DEMARCO, Géologie générale.
MICHEL Georges, Biochimie.
LEBRETON, Biologie végétale.
DAVID Jean, Biologie animale.
TOUSSET, Chimie propédeutique.

MM. FEUVRAIS, Physique Electricité.
PICARD Claude, Mathématiques.
SCHMITT, Physique M.P.C.
LAURENT, Chimie organique.
ROT, Mathématiques.
BETHOUX, Mathématiques T.M.P.
Mlle CALAIS, Mathématiques C.S.U.
M. GUSAKOW, Physique.
Mlle THOMAS, Chimie minérale.

Maître de Conférences Adjoint

M. PIERRON, Chimie.

Conseiller Administratif

M. BURNET

Secrétaire Principal Honoraire

M. ROUX

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS	5
METHODES ET MATERIELS	9
I : Recueil du LCR	9
II : Dosage des protéines totales et concentration du LCR	10
III : Méthodes électrophorétiques	12
IV : a) Electrophorèse en veine liquide	12
b) Electrophorèse sur papier	12
c) Electrophorèse bidimensionnelle	12
d) Electrophorèse en gel d'amidon	13
Glycérodessiccation	17
e) Immunoelectrophorèse	18
Analyse immunologique d'une électrophorèse en gel d'amidon	21
Autoradiographie	23
IV : Méthodes préparatives	23
A) Gel filtration	23
B) Electrophorèse préparative	23
Pévikon C 870	24
Gel de gélose	25
Gel d'amidon	25
Elution	26
V : Méthodes analytiques	26
a) Dosage du tryptophane	26
b) Hydrolyse	27
c) Dosage des acides aminés	27
VI : Ultracentrifugation	28
VII : Méthodes enzymatiques	28
Tableau général des corrélations existant entre les principales techniques électrophorétiques utilisées	
Tableau général de la nomenclature et des principales caractéristiques des protéines sériques	
Planche 4	28 bis
ETUDE DESCRIPTIVE DU PROTEINOGRAMME DU LCR HUMAIN NORMAL	29
I : Electrophorèse sur papier	29
II : Etude immunoelectrophorétique	32
III : Electrophorèse en gel d'amidon	36
VI : Electrophorèse bidimensionnelle : papier, gélose, gel d'amidon	37
V : Application de la gel filtration à l'étude du LCR normal	39
ISOLEMENT ET PURIFICATION DES PROTEINES SPECIFIQUES DU LCR	40
Gel filtration	41
Electrophorèse préparative	42
Isolement de la pré-albumine	43
Préparation des sidérophilines	43
Préparation des protéines témoins	44
Les "post-gamma" globulines et autres protéines particulières	45
ETUDE DE QUELQUES PROTEINES ISOLEES A PARTIR DU LCR	47
I : Pré-albumine	47
II : Les sidérophilines	52
III : Les "post-gamma" globulines	56
COMPARAISON DE LA COMPOSITION PROTEIQUE DU LCR AVEC CELLE D'AUTRES LIQUIDES BIOLOGIQUES	60
I : Comparaison avec les liquides endoculaires	60
Liquide sous-rétinien	60
Humeur vitrée	61
II : Comparaison avec les protéines urinaires	63
III : Comparaison avec la sueur humaine	65
Comparaison avec d'autres liquides biologiques	68
ETUDE COMPARATIVE DES MODIFICATIONS QUE SUBIT LA SIDEROPHILINE DU LCR DE CERTAINS ANIMAUX, LE SINGE BABOUIN, LE CHIEN ET LA CARPE	69
I : Le singe Babouin	68
II : Le chien	71
III : La carpe	73
Conclusions	74
ORIGINES DES PROTEINES DU LCR	75
I : Séromucoïde alpha I	76
II : Les immunoglobulines	77
III : La Pré-albumine	79
a) Culture de plexus choroïdes	80
b) Faits cliniques	83
IV : Les sidérophilines	84
V : Les "post-gamma" globulines	86
VI : Conclusions	89
CONCLUSIONS	91
BIBLIOGRAPHIE	95

LES PROTEINES DU LIQUIDE CEPHALORACHIDIEN

AVANT-PROPOS

Lorsqu'en 1959 Monsieur le Professeur PAUFIQUE m'avait proposé de me consacrer à l'étude des liquides endoculaires, j'avais commencé un travail sur les protéines des liquides sous-rétiniens. Le liquide sous-rétinien est en effet un liquide qui apparaît au cours des décollements de rétine entre la rétine et l'épithélium pigmentaire.

Cette première étude m'obligea à mettre au point des techniques électrophorétiques adaptées à de petites quantités de liquide et à utiliser comparativement différentes méthodes. Or, il m'est apparu très vite qu'il y avait des relations étroites entre la composition protéique de ces liquides sous-rétiniens et celle des liquides céphalorachidiens. Cette parenté toutefois n'était pas absolue et j'avais pu mettre en évidence de nombreuses différences que je m'étais efforcé de définir dans ma thèse de doctorat en médecine soutenue en Février 1961. Ceci m'a permis de me rendre compte de la parenté étroite qui existe entre la composition protéique des liquides oculaires et celle du liquide céphalorachidien. Pour des raisons évidentes de quantité il m'a alors paru plus simple d'essayer d'approfondir les problèmes que posaient la composition protéique du liquide céphalorachidien envisagée par rapport à celle comme du sérum sanguin, pour ensuite étudier par comparaison celles des liquides oculaires. En effet, les quantités de liquide céphalorachidien dont on peut disposer sont beaucoup plus considérables que celles des liquides oculaires.

Mais très rapidement il m'est apparu qu'il y avait en outre certaines parentés entre la composition protéique des liquides oculaires et céphalorachidiens et celle d'urines normales ou pathologiques (1). En effet, dans certains cas pathologiques de protéinuries on voyait apparaître des protéines qui ressemblaient étrangement à celles qui nous avaient semblé être spécifiques des liquides oculaires et surtout des liquides céphalorachidiens. C'est dans cet esprit que nous avons entrepris ce travail, esprit de comparaison constante de ces divers liquides biologiques

entre eux. Cette voie n'est pas nouvelle puisque DAVSON (2) dans un livre devenu célèbre en ophtalmologie avait déjà envisagé sur le plan de la physiologie et de la composition ionique, l'étude comparée des liquides oculaires et des liquides céphalorachidiens, mais inexistantes encore étaient les études portant sur la comparaison des compositions protéiques de ces liquides entre eux, tout au moins au moment où a débuté le travail de cette thèse excepté quelques travaux comparant humeur vitrée et liquide céphalorachidien. Depuis des articles fondamentaux sont apparus tout récemment (LATERRE : thèse d'agrégation 1964) (3).

Toutefois cette étude se heurte tout de suite à deux écueils :

Le premier est la difficulté que l'on a à obtenir du liquide céphalorachidien normal en quantité suffisante et lorsqu'on a pu l'obtenir en quantité suffisante sa faible teneur en protéines rendra toujours nécessaire sa concentration : elle devra être pratique, rapide et non dénaturante.

Le deuxième est l'impossibilité dans laquelle on se trouve chez l'homme d'obtenir du liquide céphalorachidien absolument normal, on conçoit aisément qu'il est hors de question de ponctionner des sujets apparemment sains et normaux uniquement pour leur retirer du liquide céphalorachidien à seule fin d'expérience ; on est donc obligé de se contenter des liquides prélevés au cours d'examens spéciaux ; or le fait même qu'il y ait une indication clinique portée nécessitant le retrait de liquide céphalorachidien pour une raison quelconque a pour conséquence la présomption d'un état pathologique du sujet à qui ce liquide a été retiré, liquide qui ne peut donc être considéré comme absolument normal.

Pour des raisons de commodité, nous nous sommes tournés vers la ponction des cadavres frais : là encore il est impossible de parler de liquide céphalorachidien normal puisque très peu de temps après la mort la barrière hémoméningée se dégrade et que certaines protéines sériques apparaissent dans le liquide céphalorachidien, ce phénomène étant toujours accompagné d'une concentration générale due à une perte d'eau par début de dessiccation.

En fait, l'identification des divers constituants protéiques se fera donc à partir de liquides céphalorachidiens prélevés chez les individus chez lesquels rien n'a été trouvé du point de vue clinique. A partir de cette identification sur des liquides céphalorachidiens apparemment normaux on essaiera d'isoler dans des liquides céphalorachidiens de cadavres certaines fractions parfaitement caractérisées dans les liquides frais, sans tenir compte évidemment des protéines qui seront apparues et que l'on ne trouve pas dans des liquides céphalorachidiens que nous avons considérés comme normaux.

Critères de base pour la normalité des liquides céphalorachidiens :

1/ Critères cliniques :

Malades qui n'ont été porteurs d'aucune lésion encéphalique. Ces liquides nous sont procurés en général par une exploration post-traumatique mais là encore il nous est arrivé de trouver des perturbations protéiques dans des liquides céphalorachidiens apparemment normaux, ce qui montre combien le problème est difficile.

2/ Critères biologiques :

Une teneur protéique qui ne devra pas excéder 0,30 g °/‰ et si possible un contrôle cytologique qui devra être normal.

Ceci dit l'étude des protéines du liquide céphalorachidien pose quatre problèmes particuliers :

a) Leur étude propre qui comprend : leur identification, si possible leur séparation, leur purification et leur étude analytique suivie d'une étude comparative avec celle du sérum sanguin dont le liquide céphalorachidien dérive en partie. De cette première comparaison des conséquences en effet pourront être tirées quant au processus même de sélectivité de la production du liquide céphalorachidien à partir du sérum sanguin.

b) La comparaison de cette composition protéique avec celle d'autres liquides biologiques : liquides oculaires, urines, liquides d'origine interstitielle divers.

c) Toutes ces comparaisons ayant établi les particularités qui sont propres au liquide céphalorachidien feront poser le problème de l'origine des fractions protéiques qui semblent caractéristiques du liquide céphalorachidien, soit qu'elles se trouvent en quantité anormalement élevée ou basse par rapport au sérum, soit qu'elles ne se trouvent pas dans le sérum.

d) Enfin un quatrième problème est posé : celui de la place de cette différenciation dans le règne animal, problème qui envisagera la composition du liquide céphalorachidien par rapport au sérum correspondant le long de l'échelle animale. Ceci également permettra de voir s'il est possible d'extrapoler à l'Homme ce que l'on trouve chez l'animal, problème important puisque dans une certaine mesure ces résultats conditionnent l'expérimentation chez l'animal.

Cette étude sera au préalable précédée d'un chapitre décrivant les différentes méthodes utilisées. C'est donc dans cet ordre que nous allons aborder l'étude

de cette question, nous réservant chaque fois que les techniques seront trop particulières à un problème déterminé de l'envisager en cours d'exposé.

Nous suivrons donc le plan suivant :

- Dans un premier chapitre nous traiterons les méthodes et le matériel.

- Dans un deuxième chapitre nous essaierons de faire une étude analytique des différents constituants protéiques du liquide céphalorachidien et de les comparer avec le sérum sanguin.

- Dans un troisième chapitre nous décrirons les méthodes qui nous ont permis d'aboutir à l'isolement de certains constituants protéiques du LCR.

- Dans un quatrième chapitre nous étudierons les caractéristiques physico-chimiques des constituants protéiques isolés.

- Dans un cinquième chapitre nous comparerons ces résultats avec ceux des liquides biologiques voisins.

- Dans un sixième chapitre nous étudierons les protéines du liquide céphalorachidien dans différentes espèces animales.

- Dans un septième chapitre, nous essaierons de donner des éléments sur l'origine des protéines du liquide céphalorachidien.

METHODES ET MATERIEL

Dans ce chapitre nous envisageons successivement :

- 1/ Le recueil du L.C.R.
- 2/ Le dosage des protéines totales et la concentration du L.C.R.
- 3/ Les méthodes :
 - électrophorétiques et immunoélectrophorétiques
 - les immun sérums spécifiques
 - autoradiographie
- 4/ Les méthodes préparatives :
 - La gel filtration
 - L'électrophorèse préparative.
- 5/ Les méthodes analytiques
 - Le dosage du tryptophanne
 - L'hydrolyse et le dosage des acides aminés
- 6/ L'ultracentrifugation
- 7/ Méthode enzymatique

I/ LE RECUEIL DU L.C.R.

Nous avons utilisé du L.C.R. de malade et du L.C.R. de cadavres.
Le L.C.R. de malades :

Il a été prélevé soit : par ponction lombaire,
 par ponction ventriculaire.

- Au cours de pneumoencéphalographies gazeuses.
- Au cours d'examens de routine.
- Au cours d'hydrocéphalies.

Pour cette étude, nous n'avons retenu que des L.C.R. :

- dépourvus d'hématies
- ayant un taux protéique inférieur à 0,4 g %.
- une cytologie pauvre, inférieure à 5 éléments par mm³ prélevés chez des

sujets apparemment sains et dépourvus de symptomatologie clinique ou radiologiques, exception faite pour les hydrocéphales.

Le L.C.R. de cadavres :

Le liquide est recueilli par ponction sous-occipitale. Chaque ponction ramène 40 à 100 ml de liquide.

Ce liquide après centrifugation présente toujours un petit culot d'hématies. Il doit être clair.

Son taux protéique est constant et de l'ordre de $0,60 \text{ g } \%$, entre la deuxième et la cinquième heure après la mort. Après ce délai, il s'élève rapidement et le liquide devient inutilisable par apparition de fractions protéiques d'origine plasmatique.

II LE DOSAGE

Nous utilisons deux techniques couplées :

1°) Le dosage suivant la technique de O. MEULEMANS (3); c'est un dosage spectrophotométrique. Ce dosage est basé sur la précipitation des protéines par de l'acide trichloracétique. L'acide trichloracétique employé est une solution à 3% préparée à partir d'acide trichloracétique à 40%.

Le dosage est établi par différence d'absorption à partir d'un témoin préparé avec du sérum physiologique. Nous utilisons pour cela des ballons jaugés de 5 ml. Ballon témoin : 1 ml de sérum physiologique + 4 ml d'acide trichloracétique.

Ballon avec L.C.R. : 1 ml de L.C.R. + 4 ml d'acide trichloracétique.

La lecture au photomètre se fait à une longueur d'onde de 4500 Å. Nous obtenons ainsi la densité optique du liquide.

Concentration protéique du L.C.R. : elle est égale au produit de la densité optique par la pente d'une courbe étalon réalisée par dilutions successives d'une solution protéique standard.

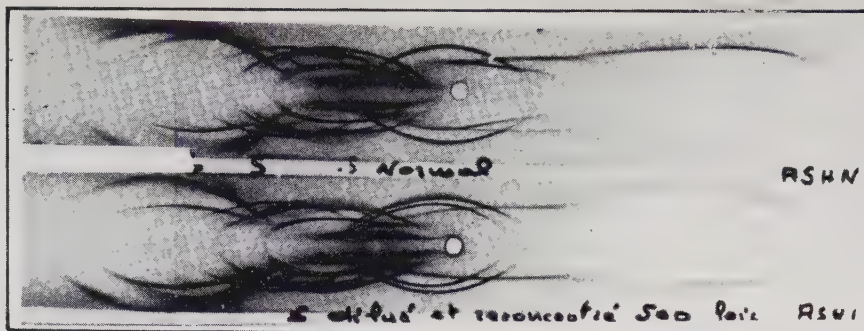
2°) Dosage colorimétrique par l'Amido-Schwarz 10 B :

Cette technique très simple dérivée de celle décrite par GROULADE (4) est d'un emploi aisé et permet une détermination immédiate : sur du papier à électrophorèse (Schleicher et Schüll, n° 2 043 a Mgl) on dépose $25 \mu\text{l}$ de L.C.R. On sèche sous Infra-rouge et on colore par un bain d'Amido-Schwarz 10 B à $10 \text{ g } \%$ dans du méthanol acide acétique (8,2 v/v). On décolore par de l'acide acétique-méthanol-eau (7,05, 2,5 v/v) et on compare à une gamme étalon.

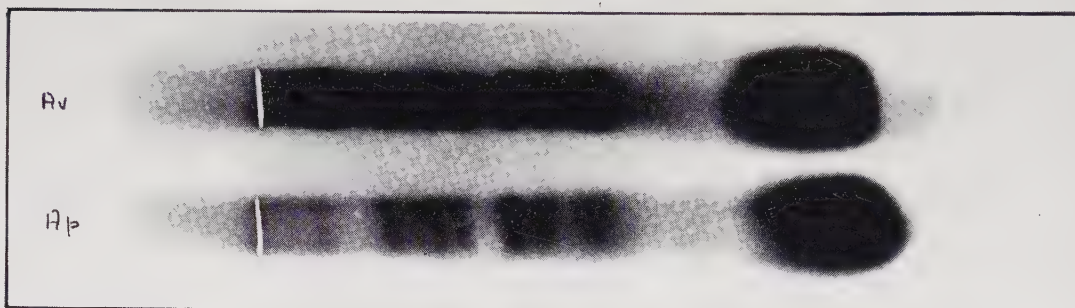
Cette méthode permet d'apprécier des quantités protéiques de l'ordre de $5 \text{ mg } \%$, avec une précision de 20% environ, permettant ainsi :

- une évaluation rapide et très économique du produit,
- d'éviter des erreurs toujours possibles par une méthode de floculations.

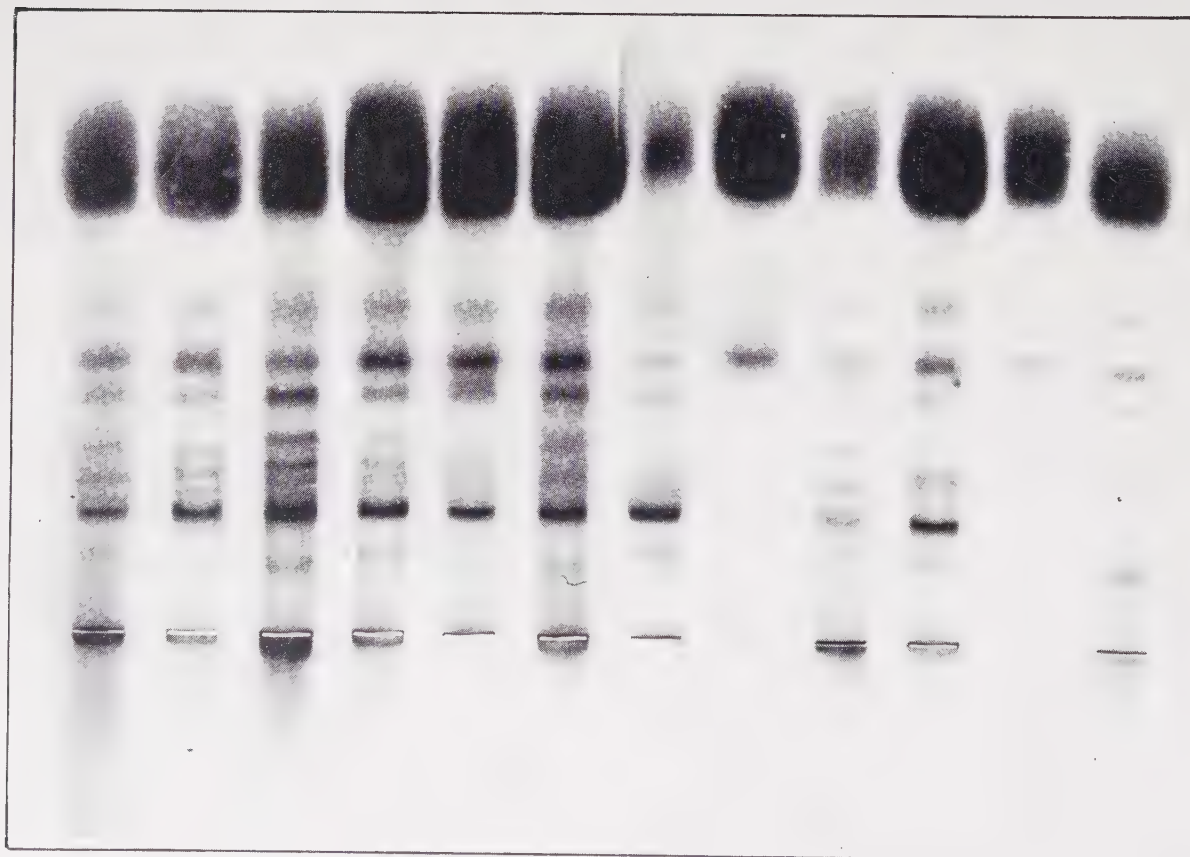
PLANCHE 1



1



2



3

La concentration

Nous nous sommes attachés à mettre au point une technique facile à mettre en oeuvre, rapide, non dénaturante.

Nous avons écarté : l'ultrafiltration, méthode peu rapide et nécessitant un matériel déjà important

La lyophilisation qui est parfois dénaturante.

La perévaporation longue et dénaturante

La précipitation par l'acétone à froid qui est incomplète.

Nous nous sommes orientés vers les méthodes de dialyse contre des solutions macromoléculaires :

a) Le sac de dialyse : il existe dans le commerce des boyaux cellulosiques parfaits pour cet usage. Nous en utilisons un de faible diamètre pour nos quantités de L.C.R. : ^X

b) La solution macromoléculaire : Son choix est important. Elle doit être d'un poids moléculaire moyen élevé pour éliminer tout passage de cette solution dans le liquide à concentrer, passage qui entraîne une dénaturation par absorption des protéines sur ces macromolécules : nous avons ainsi abandonné le Polyvinyl Pyrrolidone et nous utilisons actuellement du Polyéthylène Glycol de poids moléculaire moyen 25 000. Il nous est livré en paillettes que nous émulsionnons au Turmix à 30 000 tours à une concentration de 60 %.

Le boyau cellulosique à l'intérieur duquel a été mis le L.C.R. est plongé dans cette solution de Polyéthylène Glycol à 60 %.

Par cette technique 100 ml de liquide sont amenés à 1 ml en 2 heures.

Aucune dénaturation n'est notée sur un sérum dilué et rencontré 500 fois par cette technique. Il est à noter que sur d'autres liquides (urines par exemple), cette méthode nous permet des concentrations rapides de 1 000 à 3 000 fois sans dénaturation.

PLANCHE N° 1

Fig 1 .

Sérum normal dilué puis reconcentré 500 fois

Immuno-électrophorèse : la seule différence notée entre le sérum avant et après concentration est l'accélération de la mobilité de la ligne " β " (Ce qui correspond au vieillissement normal du sérum pendant le temps nécessaire à la concentration).

Gel d'amidon : aucune différence n'est notée.

En conclusion : aucune différence ne peut être imputée à la technique de concentration.

Fig 2 : Electrophorèse en série de sérum et d'urines pathologiques montrant la par-faite égalité du front de migration lorsqu'on utilise les "cuves à pont", modèle large.

III METHODE ELECTROPHORETIQUE

a) Electrophorèse en veine liquide (5)

On utilise un appareil Tiselius Folak F 2 Strubin. L'électrophorèse se fait en tampon véronal de force ionique 0,1 et de pH = 8,6 à une température de 2° C. On opère avec une fente de 15° sous une intensité de 20 mA. Les résultats sont exprimés en $\text{cm}^2/\text{Volts}^{-1}/\text{sec}^{-1} \times 10^{-5}$. La durée d'examen est de 6 500 secondes.

Les mesures ont été faites par le Dr R. CREYSSEL.

b) Electrophorèse sur papier

C'est une technique peu sélective, mais qui demeure indispensable pour avoir une première approximation quantitative des différentes fractions protéiques. Elle n'est pas sans inconvénients : en effet, à l'action du champ électrique s'opposent celle des courants d'électro-endosmose de direction inverse qui perturbent considérablement la migration protéique, ainsi que des phénomènes d'évaporation. Ces faits sont trop connus pour que nous les étudions en détail mais ils expliquent qu'il soit impossible d'obtenir par électrophorèse sur papier des mobilités qui soient rigoureusement les mêmes d'une migration à l'autre. Néanmoins cette technique simple donne une approximation très suffisante et permet une première étude à la fois qualitative et quantitative intéressante.

Nous utilisons l'appareil mis au point par GROULADE (6) qui permet d'opérer dans des conditions optima autorisant des migrations sur 6 ou 7 bandes à la fois ; il permet des comparaisons de mobilités d'une bande à l'autre ; en effet un double dispositif assure une étanchéité parfaite et une évaporation presque inexistante : ceci permet un front de migration linéaire d'une bande de papier à l'autre.

Nos migrations sont réalisées sous une différence de potentiel de 70 volts aux bornes de l'appareil (3 volts/cm) pendant une durée de 16 heures.

Nous utilisons comme colorant l'Amido-Schwarz 10 B en solution méthanol acide acétique, comme décolorant des bains successifs d'un mélange méthanol-acide-eau. Enfin, la lecture des résultats est effectuée par photométrie. ^X

c) Electrophorèse bidimensionnelle

Ce procédé imaginé par POULIK et SMITHIES a été modifié par FINE (7) Son principe est simple : il consiste à découper en bandes longitudinales une migration électrophorétique. Chaque bande est analysée par d'autres méthodes électrophorétiques permettant ainsi une étude comparative des résultats d'une méthode à l'autre.

L'électrophorèse bidimensionnelle se fait sur papier Whatman n° 1 de forme rectangulaire et de dimensions 31,5 x 26 cm.

Nous utilisons la cuve GROULADE décrite ci-dessus, la linéarité de la migration est ici précieuse pour des raisons évidentes. La feuille est imbibée de

X : Enregistreur d'extinction avec intégrateur ZEISS

tampon d'HIRSCHFELD (cf page 20); la migration dure 6 heures sous une différence de potentiel de 170 volts. Chaque bande de papier découpée mesure 0,75 cm de large et est élue à la seringue. On fait ensuite migrer parallèlement pendant 3 heures, en gélose chacune des 20 fractions obtenues. On est ainsi en présence de 16 à 18 fractions utilisables, chacune d'entre elles est ensuite étudiée en immunoélectrophorèse et en gel d'amidon suivant les techniques habituelles. Il est alors très facile de comparer les mobilités en amidon et en immunoélectrophorèse des composants protéiques obtenus avec celle d'un sérum témoin.

d) Electrophorèse en gel d'amidon

La deuxième technique d'électrophorèse de zone que nous avons utilisée, est la technique d'électrophorèse en gel d'amidon. Le support utilisé est composé d'un gel fabriqué à partir d'un amidon partiellement hydrolysé.

Si l'encombrement de la molécule ne jouait qu'un rôle restreint par rapport à sa charge électrique dans l'électrophorèse sur papier, il devient au contraire un facteur non négligeable dans la technique en gel d'amidon que l'on doit à SMITHIES (8).

En effet, on peut grossièrement considérer que le gel d'amidon se conduit comme un tamis moléculaire superposant ainsi aux critères purement électriques un autre critère : la dimension et la forme de la molécule. La finesse de ces mailles freine les grosses molécules protéiques, laissant au contraire librement passer les petites molécules. Ainsi, migreront très en avant les molécules de faible poids moléculaire et resteront au contraire près de la fente d'inclusion les molécules de gros poids moléculaire, ceci à charge électrique égale. Enfin, les très grosses molécules protéiques ne pourront pas migrer dans ce gel quelle que soit leur charge électrique. Cette technique se révèle, quant au sérum, très précieuse puisqu'elle permet de séparer un très grand nombre de constituants que l'électrophorèse sur papier ne permettait pas d'individualiser.

1/ Fabrication du gel d'amidon

Nous utilisons pour la fabrication de ce gel la technique de SMITHIES modifiée par FINE (9). Nous nous servons d'un amidon préparé industriellement ^X. Sur chaque lot, en effet, on trouve indiqué la quantité d'amidon utilisable pour 100 ml de tampon, tampon dont la composition a été étudiée en fonction du degré d'hydrolyse de chaque lot.

La quantité d'amidon indiquée (13 g % environ) est mélangée à froid par agitation énergique avec le tampon choisi, dans un Erlenmeyer en Pyrex. On chauffe ensuite directement à la flamme d'un bec Bunsen sans jamais cesser d'agiter. Au bout de quelques minutes, la solution d'amidon s'est épaissie pour devenir adhérente aux parois de l'Erlenmeyer : cette pâte va se reliquéfier et devenir translucide.

X : Le Connaught Medical Research Laboratory de Toronto.

Des bulles de plus en plus grosses vont se former au fond du récipient ; on peut alors arrêter le chauffage ; on fait le vide dans le ballon pour dégazéifier le gel liquide. Il suffira ensuite de le couler dans des cuves préparées à cet effet et de le laisser refroidir.

A ce stade quelques précautions doivent être prises :

- La première concerne la quantité d'amidon à préparer pour 100 ml de tampon. Il s'agit en effet d'un amidon partiellement hydrolysé, or, la quantité d'amidon à utiliser pour la fabrication du gel dépend étroitement du degré d'hydrolyse de cet amidon. Il est assez facile avec l'habitude de se rendre compte de la consistance du gel obtenu. Le gel d'amidon devra en effet avoir un aspect parfaitement opaque après refroidissement, légèrement rénitent au doigt, à la fois souple et résistant. Or, parfois, le gel refroidi est translucide, visqueux ; la quantité d'amidon est alors trop faible ; il faudra par tâtonnement, rechercher la quantité optima d'amidon.

- La seconde précaution à prendre est d'éviter un chauffage trop prolongé. On a souvent intérêt à chauffer moins et à commencer la dégazéification à la limite même de l'ébullition sous vide, de la solution d'amidon après chauffage.

- Enfin une dernière précaution consiste à agiter vigoureusement le mélange pendant toute la durée du chauffage, sans interruption.

Au bout de 2 heures environ le gel coulé se refroidit et se présente comme une masse homogène, opalescente, légèrement résistante au doigt.

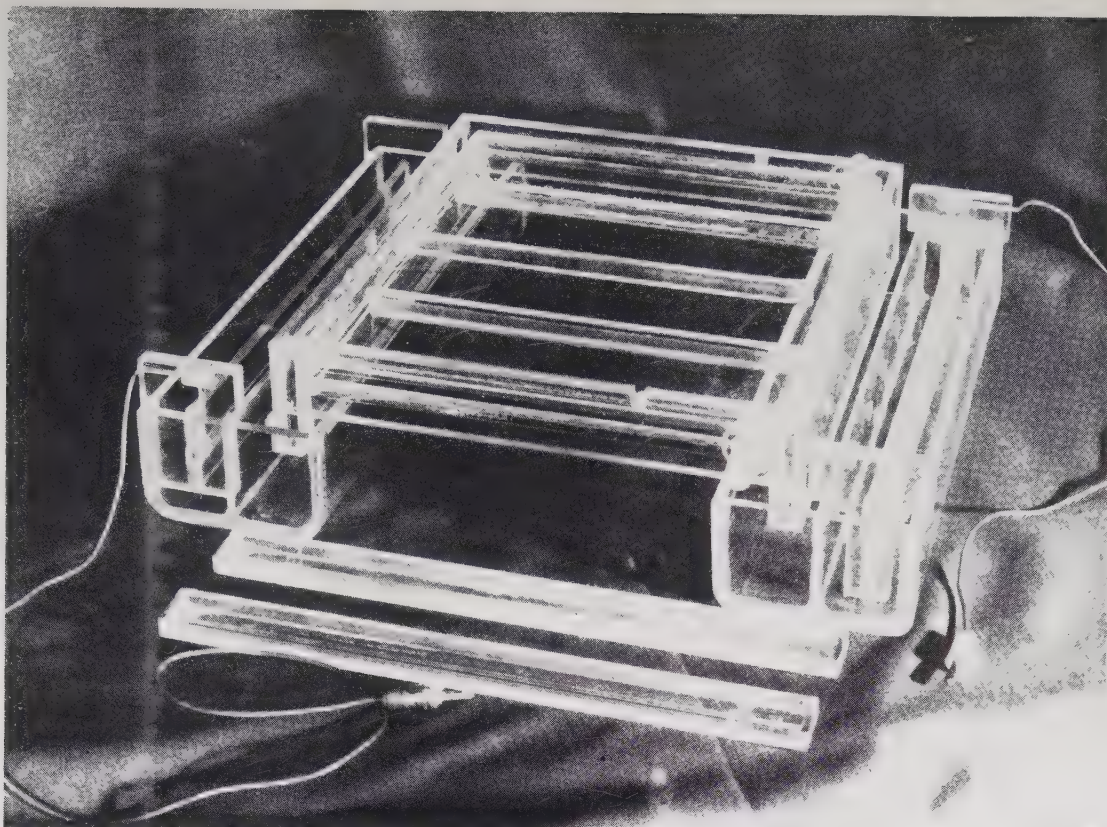
Le gel est ensuite arasé ; la couche supérieure est jetée, la couche inférieure a alors une épaisseur de 6 mm, condition d'une migration régulière.

A l'aide d'un emporte-pièce (10 x 1 mm), on découpe alors une fente dans le gel, dans lequel on inclut le liquide à analyser suivant un protocole que nous verrons plus loin. Les fentes sont distantes les unes des autres de 7 à 10 mm. On doit prendre une précaution essentielle : il faut vérifier que lors de la préparation de la fente d'inclusion, on n'a pas décollé le gel de la cuve qui lui sert de support en retirant l'emporte-pièce. Cette vérification se fait par transparence devant une lampe sinon il peut se produire des diffusions du produit inclus d'une fente à l'autre. Si une bulle d'air est ainsi repérée, il suffit de la chasser en réappliquant au doigt le gel.

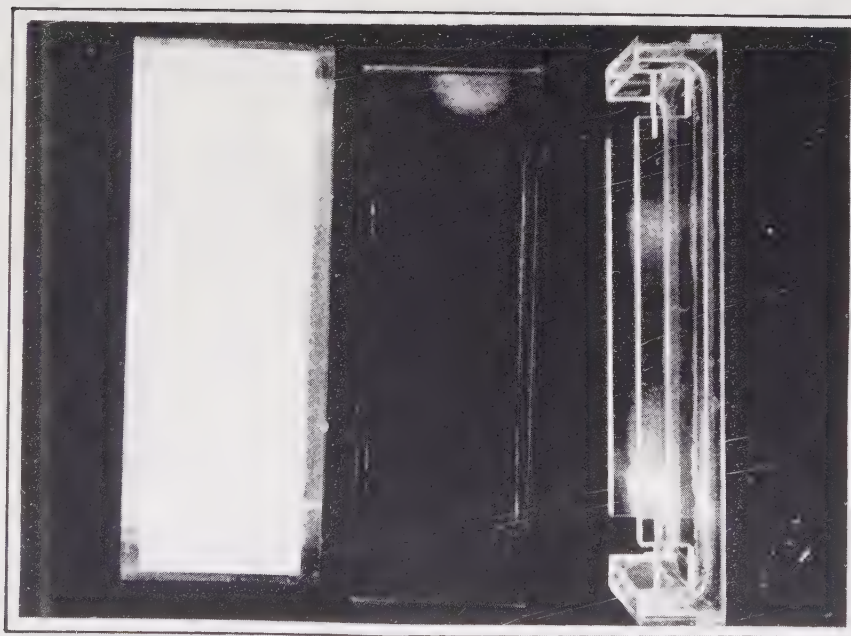
PLANCHE N° 2

Fig 1 : Cuve "à pont" modèle large, refroidie, vue en place sur des bacs "porte-électrode" de grande capacité.

Fig 2 : Cuve "à pont" modèle standard vue de face* avec le gel d'amidon et les fentes d'inclusion ;
 de profil, montrant les renforts en plexiglas et les ponts ;
 au milieu d'une glissière en plexiglas pour le découpage des gels en tranche de 6 mm d'épaisseur.



1



2

Cuves de migration :

La conception des cuves que nous utilisons pour nos gels d'amidon est entièrement originale.

Principe : En 1959, lorsque nous avons commencé cette étude, tous les auteurs utilisaient des cuves en matière plastique dans lesquelles le gel d'amidon était coulé. Le raccordement du gel d'amidon avec le tampon des cuves porte-électrodes, se faisait par l'intermédiaire de papier filtre. Les migrations obtenues étaient assez irrégulières.

Dès cette époque, nous avons imaginé des cuves en matière plastique, qui permettaient un contact direct entre le gel d'amidon et le tampon de la cuve porte-électrode. Nous avons décrit des cuves répondant à ce principe dans notre thèse de Médecine en 1961, et nous avons appelé ces cuves : cuves à ponts. Nous avons ensuite standardisé le modèle de cuve en deux modèles :

a) Modèle standard : ce modèle présente une surface utile d'amidon de 22 x 8 cm. L'épaisseur du gel d'amidon obtenu est de 6 mm, la longueur totale de la cuve est de 26 cm compte tenu de l'épaisseur des ponts eux-mêmes. La longueur des ponts est de 3 cm. La photographie de cette cuve permet d'en comprendre mieux la forme. (planche 2) Les cuves sont faites en plexiglas d'une épaisseur sur les côtés de 1 cm, qui en assurent une parfaite rigidité. La largeur de 8 cm permet de faire 3 fentes d'inclusion par cuve ; ces fentes d'inclusion sont faites à 6 cm d'un des bords de la partie utilisable des gels, ce qui correspond à 8 cm d'une des extrémités de la cuve.

b) Cuve large : nous utilisons pour des migrations comparatives, des cuves de même conception, mais d'une largeur beaucoup plus grande : 28 cm de large, les autres constantes étant identiques.

Elles permettent 12 inclusions simultanées. Ce modèle de cuves a été utilisé de façon constante pour les méthodes préparatives que nous décrirons plus loin.

Cuves porte-électrodes : Nous utilisons des cuves de très grande capacité qui comprennent deux compartiments : un compartiment porte-électrodes relié par l'intermédiaire d'une cloison en matière plastique percée de trous de communication, un deuxième compartiment dans lequel seront placés les ponts des cuves que nous venons de décrire.

La longueur de ces bacs permet de placer 3 cuves à la fois, permettant 9 électrophorèses simultanées.

Dimensions de ces bacs porte-électrodes : longueur 32 cm, largeur 9 cm; hauteur 6 cm. Les compartiments ont chacun 4,5 cm de large. La barette porte-électrodes a une longueur de 28 cm, l'électrode elle-même est constituée par un fil de platine de 8/10 mm de diamètre. La longueur de cette électrode permet une répartition électrique meilleure.

Enfin quelles que soient les cuves utilisées, pendant toute la durée de migration, on place sur les cuves une plaque plexiglas, distante de 0,5 cm du gel,

plaque recouvrant toute la surface du gel.

2/ Les tampons utilisés :

Ils sont de 3 sortes : tampon continu borate-borate, tampon discontinu tris-borate, enfin tampon spécial glycolle-soude.

Le tampon utilisé de façon standard est le tampon continu borate-borate. Il faut en effet distinguer le tampon qui sert à faire les gels mêmes et le tampon que l'on met dans les cuves.

Le système sera continu si les 3 tampons sont de même nature, discontinu si les tampons sont de nature différente. L'avantage du tampon discontinu réside dans une meilleure définition des bandes protéiques séparées. Il se produit par ailleurs un front de migration du tampon cuve dans le gel, ce qui permet de suivre, dans une certaine mesure, la migration elle-même.

Dans nos études standard nous avons toutefois préféré utiliser le tampon continu car ce système était celui qui nous donnait les meilleures séparations concernant les protéines particulières du liquide céphalorachidien.

a) Tampon continu borate-borate :

Le tampon "gel" : sa composition varie avec le degré d'hydrolyse de l'amidon. Il est composé d'une solution à 0,023 M d'acide borique et de 0,0092 M de NaOH.

Le tampon "cuve" est composé d'acide borique 0,3 M et NaOH 0,06 M à pH 8,4.

b) Tampon discontinu tris-borate :

Dans le tampon "gel" : Tris (hydroxyméthyl) amino-méthane 0,076 M, acide borique 0,005 M à pH 8,4.

Le tampon "cuve" est identique au précédent.

c) Tampon discontinu glycolle-soude :

Tampon "gel" : Glycolle 0,05 M ajusté à pH 8,8 par NaOH 0,06 M

Tampon "cuve" : tris (hydroxyméthyl) aminométhane amené à pH 9,2 par HCl 0,1 M.

3/ Techniques d'inclusions

La technique d'inclusion est dérivée de celle décrite par FINE. La méthode que nous utilisons a l'avantage de ne demander que peu de produit, d'être rapide et de permettre des dilutions complémentaires.

On prépare 10 ml d'une solution d'amidon soluble Merck avec le tampon utilisé pour la fabrication des gels dans un Erlenmeyer de 20 ml on chauffe jusqu'à

éclaircissement et début d'ébullition de cette solution. On refroidit à 50° C sous l'eau et dans un petit tube, juste avant l'inclusion on mélange 2 gouttes de cette solution avec 2 gouttes de produit à analyser. On évite ainsi toute dénaturation due à la chaleur.

Il est parfaitement possible de modifier ceci et de mettre des rapports 2 pour 3, 1 pour 3, 1 pour 4 gouttes. Ceci permet en cas d'échantillon de faible teneur protéique, d'augmenter d'autant la concentration relative de cette protéine.

Après mélange à la pipette on dépose au fond de la fente d'inclusion la solution obtenue.

Pour les sérums nous les diluons au préalable avec une solution à 1 ‰ de bleue de Chicago (Geigy 536) dans du sérum physiologique. En effet, un des inconvénients de la technique en tampon borate-borate est qu'elle ne permet pas de suivre la migration. Or, le bleu Geigy se fixe électivement sur l'albumine humaine sans la dénaturer, permettant ainsi de suivre sa migration, qui sert de repère. La labilité de sa fixation sur l'albumine est telle que ce colorant ne gêne en rien les colorations ultérieures.

Cette précaution est importante car, comme nous le verrons pour le liquide céphalorachidien, il est indispensable d'obtenir des migrations relativement courtes car les fractions les plus intéressantes migrent très en avant de l'albumine et très en arrière des γ globulines.

4/ Démoulage, coloration, décoloration, et conservation

Le démoulage se fait dans une solution d'acide acétique à 5 % pour éviter toute cassure. Le gel démoulé est pris sur une plaque en plexiglas que l'on retourne, ce qui permet de le retirer du bain sans aucune manipulation ; il est ensuite retourné sur une glissière en matière plastique d'une profondeur de 3 mm. A l'aide d'un fil d'acier, on coupe ce gel en deux tranches de 3 mm chacune ; on garde la partie inférieure qui est colorée à l'Amido Schwarz 10 B, colorant qui s'avère supérieur à l'azo carmin, d'une part parce qu'il supporte mieux la coloration et d'autre part parce qu'il a un meilleur rendement à la photographie. Le bain colorant est obtenu en diluant 50 fois dans de l'acide acétique à 5 %, une solution stock d'Amido Schwarz à 1 % dans un tampon acide acétique (0,50 M) acétate (0,05 M). Après une durée de coloration de 30 minutes il est ensuite décoloré dans des bains successifs d'acide acétique à 5 % de 24 heures chacun.

On attend la décoloration totale et on photographie par transparence sur film Kodak "plus X".

"Glycérodéssication" du gel obtenu :

Si on veut pousser plus loin l'étude des constituants, et, principalement si on veut essayer de faire une analyse quantitative, il est possible de rendre le gel à la fois transparent et manipulable : il faut après coloration, mettre le gel dans une série de bains décolorants d'acide acétique à 5 % et de glycérol bidistillé à 10 %.

En fin de décoloration, le gel est disposé sur une plaque de verre et mis à l'étuve à 70° C (Technique de GROULADE modifiée) (10)

Au bout de 3 heures environ on décolle les bords du gel pour éviter toute déchirure. Ensuite, au bout de 24 à 48 heures la dessiccation est complète et le gel ressemble lui-même à une feuille plastique : il est très souple, parfaitement transparent et se prête aux analyses photométriques comme aux procédés de révélation par contact (autoradiographie par exemple).

e) Immunoélectrophorèse

Due à GRABAR et WILLIAMS, cette technique se fait en 2 temps.

a) une migration électrophorétique avec comme support un gel de gélose.

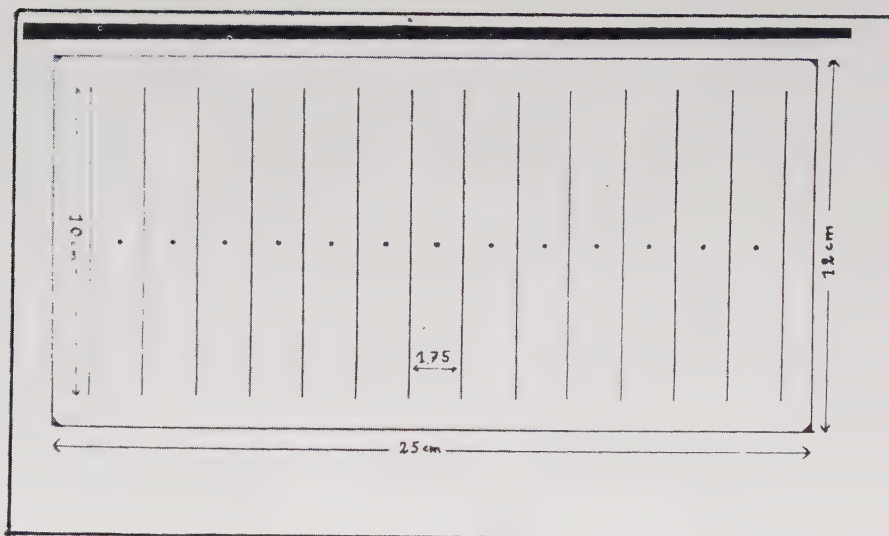
b) une révélation immunologique des fractions ainsi séparées. Les résultats de l'électrophorèse en gélose sont superposables à ceux de l'électrophorèse sur papier. Cette technique permet de séparer 5 fractions protéiques dans le sérum : albumine, α 1 globuline, α 2 globuline, β globuline et γ globuline.

On dispose ensuite dans des rigoles découpées parallèlement à l'axe de migration un sérum, généralement de Cheval ou de Lapin, préalablement immunisé contre du sérum humain ou du L.C.R. humain. Ce sérum contient donc des anti-corps anti-protéines humaines ou anti-protéines du L.C.R. Chaque anti-corps est spécifique d'une de ces protéines qui se conduit elle-même comme un antigène. Il est possible par cette technique de différencier de nombreuses autres catégories protéiques dans les fractions protéiques qui ont été préalablement dissociées par l'électrophorèse en gélose.

Rappelons pour terminer que si la diffusion de l'immunsérum est une diffusion linéaire parallèle à cette rigole, la diffusion des protéines, elle, est une diffusion concentrique à la tache de migration de cette protéine puisque dans la technique que nous utilisons l'inclusion est punctiforme ; cela explique que la ligne de précipitation antigène anti-corps soit une ligne courbe. Cette notion appelle une remarque importante : la rapidité de diffusion dans le milieu gélose de l'immunsérum est toujours la même pour une série d'immunoélectrophorèses considérée, puisque l'immunsérum utilisé est le même. Par contre, la rapidité de la diffusion dans la gélose de chaque fraction protéique va être étroitement dépendante de sa forme et de sa masse moléculaire si bien qu'une protéine de faible encombrement ou de faible masse moléculaire, diffusera beaucoup plus vite qu'une macromolécule par exemple. Ainsi donc, la place même par rapport à l'axe de migration de la courbe de précipitation antigène-anticorps pourra donner une idée sur la dimension de la molécule protéique qui l'a produite.

Un deuxième point intéressant à noter est la difficulté qu'il y a à obtenir une ligne de précipitation dont l'intensité soit proportionnelle à la quantité de protéines qu'il a produite. En effet, si on utilise l'immunsérum de Cheval il existe un rapport optimum antigène-anticorps, rapport optimum qui conditionne l'intensité de la ligne de précipitation observée. Pour l'immunsérum de Cheval ce rapport se situe dans des limites relativement étroites, tout excès d'antigène par rapport à l'anticorps, ou,

PLANCHE 3



1



2

inversement, tout excès d'anticorps par rapport à l'antigène, provoquera une redissolution partielle ou complète de cette ligne de précipitation, si bien qu'il faut savoir qu'une absence, ou une faible ligne de précipitation ne veut pas forcément dire absence ou faible quantité de la protéine correspondante, mais peut vouloir dire aussi excès de cette protéine par rapport à l'anticorps apporté par l'immunsérum, ou, inversement, excès par rapport à la protéine considérée. Ce phénomène correspond à une courbe "d'équivalence étroite" en opposition à la courbe "d'équivalence large" qui caractérise d'autres animaux : c'est ainsi que chez le lapin ou la chèvre les anticorps produits donnent des réactions de précipitation antigène-anticorps qui sont beaucoup moins sensibles au rapport antigène-anticorps. (Equivalence large).

Il n'est pas dans notre propos d'examiner toutes les techniques d'immuno-électrophorèse ; la technique que nous proposons nous est personnelle et semble-t-il originale. Cette technique est dérivée de la microtechnique de SCHEIDEGGER (11) Toutefois nous l'avons considérablement modifiée. Nous utilisons une plaque de verre de 25 x 8 cm qui nous permet de faire 13 à 14 migrations parallèlement les unes aux autres.

PLANCHE N° 3

Fig 1 :

Schéma des fentes sur lequel est déposé la plaque de gélose. A main levée en suivant les repères à travers la plaque de gélose on fait un prédécoupage des rigoles où sera mis l'immunsérum et on découpe avec un tro-car relié à une trompe à vide les trous d'inclusion.

Fig 2 :

Résultat d'une migration " en parallèle" de 9 sérums différents : les mobilités des différentes lignes de précipitation sont rigoureusement identiques d'une migration à l'autre.

En effet notre principale préoccupation a été l'identification de fraction protéiques par rapport à celles déjà bien connues du sérum sanguin. Il était donc indispensable que nous ayons à notre disposition une technique qui permette de comparer très exactement les mobilités de chaque ligne de précipitation obtenue. Il fallait donc avoir des conditions de migration parfaitement standardisées et rigoureusement parallèles. Il fallait en plus une technique d'emploi suffisamment simple pour être utilisée en série. Nous donnons un schéma explicatif. (planche 3)

a) Préparation des plaques de gélose :

La gélose que nous utilisons est une gélose^x très pure que nous préparons en solution stock à 6 %. La gélose est dissoute à l'étuve à 90° C pendant 48 heures dans de l'eau distillée. Elle est ensuite étalée en couche de 1 à 2 cm et après refroidissement elle est découpée en petits cubes et mise à dialyser pendant 8 jours dans de l'eau distillée additionnée d'azothydrate de sodium à 1 ‰ pour éviter toute pousse bactérienne. Les cubes deviennent ensuite parfaitement blancs et sont propres à leur utilisation.

Pour l'électrophorèse elle est ensuite ramenée à une concentration de 1,5 ‰. Le tampon utilisé pour ces migrations est celui d'HIRSCHFELD (12) dont la composition est la suivante :

Pour 10 l de tampon : Véronal sodé : 105,10 g
 Véronal acide : 16,60 g
 Lactate de Calcium (5 H₂O) 15,36 g

Après plusieurs essais nous avons préféré ce tampon au tampon véronal-véronal sodique de DURRUM (force ionique 0,05) qui sépare mal les fractions β 2 et au tampon de MICHAELIS véronal-acétate-HCL qui est trop sensible au vieillissement. Le tampon au Lactate de Calcium par contre sépare parfaitement la zone α 1 et α 2 ainsi que la zone β 2. Il est d'une souplesse d'emploi importante et ne nécessite pas un renouvellement fréquent.

b) Migration et révélation :

Sur une plaque de 25 x 10 cm nous déposons 60 ml de gélose à 60° C. Après refroidissement nous posons cette plaque sur une feuille de papier où aura été tracé le schéma des fentes et des poids d'inclusion à faire dans cette gélose comme le montre la planche 3. Ceci fait très simplement par 2 lames de rasoir accolées sur une plaque de plexiglas qui les maintient rigides et espacées de 1,5 mm. Le tracé des rigoles dans lequel sera ensuite mis l'immunsérum est fait à main levée. avec une certaine habitude ceci se fait très rapidement et de façon très satisfaisante. La migration est conduite dans la cuve type GROULADE que nous avons décrite plus haut.

^x : Difco Bacto-Agar.

Les conditions d'humidité constante caractéristiques de cette cuve permettent des migrations strictement parallèles d'une extrémité à l'autre de la plaque. La migration a une durée comprise entre 2 et 3 heures sous une différence de potentiel de 60 volts. Une fois la migration effectuée nous enlevons la petite bande de gélose, dans les rigoles qui ont été préalablement découpées, nous y mettons l'immunsérum et nous laissons diffuser 48 heures. La plaque est ensuite lavée au sérum physiologique pendant 48 heures puis lavée une deuxième fois à l'eau distillée pour éliminer les sels pendant quelques heures et ensuite séchée sous une lampe à rayonnement infra-rouge durant 2 heures.

La plaque est mise dans un bain colorant qui a été fait à partir d'un mélange d'acide acétique à 5 % et d'une solution stock composée d'Azocarmin à 1 % dans un tampon acide acétique-acétate.

La coloration dure 1/4 d'heure, la décoloration est très rapide. Elle se fait dans un bain d'acide acétique à 5 % pendant 15 minutes ; la plaque est séchée et prête à être photographiée.

c) Analyse immunologique d'une électrophorèse en gel d'amidon :

Une telle analyse est impossible à faire directement. En effet l'opacité du gel empêche toute révélation des lignes de précipitation. Cette analyse immunologique est pourtant extrêmement précieuse puisqu'elle permet d'analyser des sous fractions protéiques et elle est de plus extrêmement sensible. Nous proposons un artifice qui permet de résoudre de façon satisfaisante ce problème. Après électrophorèse en gel d'amidon nous démoulons directement le gel sur la glissière en plexiglas que nous avons décrite. Ce temps est effectué sans fixation préalable. Une des tranches de 3 mm est colorée normalement et sert de témoin. La deuxième tranche est posée sur sa section sur une plaque de gélose 28 x 10 préparée dans les conditions qui ont été décrites plus haut.

Directement sur une plaque, on découpe au bistouri, en prenant soin de ne pas toucher la gélose, le gel d'amidon de façon à éliminer les bandes de gel qui se trouvent entre les migrations. Entre les 3 bandes restantes, on découpe avec le même dispositif que celui utilisé pour l'immunoélectrophorèse, une rigole située à égale distance des bandes restantes.

Les fractions protéiques situées sur la tranche de section du gel vont diffuser dans la gélose qui est à leur contact. Au bout de 24 heures, on enlève les bandes de gel d'amidon. Au bout de 3 heures on avait au préalable mis un immunsérum dans la rigole préparée à cet effet. On est alors placé dans les mêmes conditions que pour le dernier stade de l'immunoélectrophorèse classique.

Cette méthode donne des résultats excellents et nous a été particulièrement utile pour les autoradiographies.

d) Immunsérums utilisés :

Migrations standards : les immunsérums de référence sont constitués d'un mélange à parties égales d'immunsérums équins N° 223 et 306. ^x

Immunsérums spéciaux :

Immunsérum anti-préalbumine

- anti α 2 macroglobuline Behringwerke (Pr SCHULTZE)
- anti α 2 macroglobuline)
- anti complément)
- anti β lipoprotéines) dus à l'obligeance du Docteur
- anti sidérophiline) SOOTHIL de Birmingham
- anti γ globulines)
- anti albumine)

Immunsérums anti-L. C. R. révélant la "post γ " que nous devons à l'obligeance du Dr LATERRE De Louvain.

Immunsérums spécifiques personnels :

- anti β 2A globuline : obtenu par absorption d'un immunsérum standard par un sérum humain dépourvu de β 2A globulines.

- anti-L.C.R. : obtenu par immunisation de Lapins : des Lapins de 2 à 3 kg sont injectés par voie intra-péritonéale avec un mélange de 3 parties d'alginate de Na (à 4 %) et d'une partie de chlorure de calcium 1 %. Puis on introduit par la même voie 1 ml de concentrat de L.C.R., l'alginate jouant le rôle d'adjuvant. Après 3 semaines, on injecte 0,5 ml de solution par voie intra-péritonéale, le lendemain et le jour suivant on injecte par voie intra-veineuse 0,5 ml de solution concentrée de L.C.R. diluée dans 0,5 ml de sérum physiologique. Quinze jours plus tard le sang de Lapin est recueilli par ponction cardiaque sans sacrifier l'animal, et additionné d'azothydrate de Na à 1°/∞. (Le Dr BETUEL du Centre de Transfusion sanguine de LYON s'est chargé de nos immunisations).

- anti fraction urinaire après gel filtration sur Séphadex G 200.

Une remarque importante doit être faite : les fractions spécifiques du liquide céphalorachidien se prêtent mal à l'immunisation, il faut donc immuniser des séries importantes d'animaux pour obtenir un résultat. Nous n'avons personnellement jamais pu disposer de plus de 2 animaux par série. Ceci explique que nous n'ayons jamais pu obtenir d'immunsérums révélant certaines protéines spécifiques du L.C.R. Nous remercions particulièrement le Dr LATERRE qui a bien voulu nous donner une quantité importante d'immunsérums spécifiques.

d) Autoradiographie

Pour caractériser la sidérophiline sur les différentes techniques utilisées, nous avons utilisé la propriété qui la caractérise : sa capacité de fixation du Fer. Nous l'avons saturée en fer radioactif ^{59}Fe .

$^{59}\text{Fe}^{2+}$: en solution sous forme de chlorure bivalent.

Période : 41,5 jours. Rayonnement β et γ , γ prédominant.

Film radio monocouche ^{XX}

IV METHODES PREPARATIVES :

A/ "Gel filtration" :

Notre technique est conforme à celle décrite par FLODIN et KILLANDER (1962). Nous utilisons le "SEPHADEX" G 200 dans des colonnes de 2 x 50 cm et de 3 x 100 cm. Le Séphadex G 200 retient les protéines d'un poids moléculaire inférieur à 200 000 et en permet donc la séparation.

Le gel de Séphadex est équilibré en tampon Tris (0,2 M ou 0,1 M) -ClNa 0,2 M amené à pH 8,8 par la quantité nécessaire d'HCl 0,2 M.

L'échantillon d'un volume de 5 ou 12 ml suivant la colonne est introduit au moyen d'un tube capillaire.

Les fractions éluées sont de 5 ml, le débit de 8 ml/heure. Elles sont prises dans un ensemble collecteur de fraction et enregistreur automatique.^{XXX} L'ensemble collecteur et colonne est réfrigéré par une solution de glycol refroidie à 2°. L'éluat est analysé à 2 450 Å. Les fractions sont ensuite regroupées puis reconcentrées et étudiées par les diverses méthodes électrophorétiques déjà décrites.

Je remercie le Dr RICHARD qui m'a fait partager sa grande expérience en ce domaine.

B/ Electrophorèse préparative

- Le problème : il nous fallait trouver une technique de séparation des protéines d'après nos critères électrophorétiques qui réponde aux impératifs suivants :

- permettre une séparation presque parfaite et rapide
- n'être pas dénaturante
- permettre une élution facile des diverses fractions séparées
- enfin être à la mesure de nos moyens financiers.

X : Kodirex mon couche Kodak.

XX : Préparé et distribué par le CEA.

XXX : Ensemble Collecteur - Enregistreur automatique Uvicord LKB Uppsala Suède.

- Le matériel : Nous avons utilisé les cuves en plexiglas à pont que nous avons décrites plus haut. Mais il était essentiel d'obtenir un front de migration parfaitement rectiligne condition qui seule permet un découpage correct. Nos premiers essais nous donnaient des résultats moyens.

Or l'influence de la température sur le pouvoir séparateur des protéines par électrophorèse telle qu'elle a été étudiée dans le cas de l'électrophorèse en bloc d'amidon par LOWENTHAL, nous a incité à refroidir nos cuves en particulier pour nos électrophorèses sur support inerte. Or le problème à résoudre est de refroidir le support de façon homogène et suffisamment efficace.

Dans cet esprit nous avons utilisé des cuves dérivées de celles décrites pour le gel d'amidon : mais cette fois elles possèdent un double fond dans lequel 3 bandes en plexiglas alternées facilitent le brassage du liquide réfrigérant. La plaque de plexiglas au contact du support (gel, milieu inerte) a une épaisseur de 2 mm.

Les cuves sont refroidies par un courant de liquide à 0°C obtenu à partir d'un bac de 80 litres thermostaté contenant un mélange de glycol refroidi par un groupe frigorifique à compresseur.

Les cuves utilisées ont une capacité de :

Cuves standards : 3 ml de substance
Cuves larges : 15 ml de substance

- Les supports :

PEVIKON C 870 : Il s'agit d'une électrophorèse séparative sur support inerte selon la technique décrite par BOCCI (1963). (13). Ce support est un copolymère de chlorure de vinyle et d'acétate de vinyle.

Les tampons utilisés sont de deux sortes :

Véronal-véronal sodique-lactate de calcium (HIRSCHFELD)	) pH 8,4
Acide Borique-soude 0,2 M	

Nous discuterons plus loin les inconvénients et les avantages de ces différents tampons.

L'inclusion : la cuve de plexiglas présente sur chacune de ses faces latérales à 8 cm du bord de la cuve une encoche de 6 mm de large permettant la mise en place d'une pièce d'acier inoxydable comportant 2 lames parallèles munies d'un rebord distantes de 6 mm et soudées entre elles à leurs deux extrémités.

Une pression permet d'inclure cet appareil dans le Pévikon au niveau des encoches. Le Pévikon compris entre les lames est alors enlevé au moyen d'une spatule et remplacé par le mélange de l'échantillon étudié avec du Pévikon sec jusqu'à obtention d'une pâte homogène et suffisamment fluide pour couler dans l'intervalle d'inclusion. On retire ensuite les lames et une pression légère sur l'inclusion permet de combler le vide laissé par l'appareil à inclusion.

La faible épaisseur de la couche de Pévikon (6mm) a un double avantage : elle permet une température homogène et une migration régulière des fractions qui en coupe ne présentent que faiblement la section trapézoïdale à grande épaisseur de Pévikon.

Pour une différence de potentiel de 280 volts aux bornes du générateur, l'intensité est de 5 mA. L'équilibre thermique est obtenu en 1 heure environ et la température moyenne dans le Pévikon passe de 2° à 17° C au niveau des ponts de la cuve.

Repérage et élution des fractions :

Le repérage est fait au moyen d'une bande de papier à électrophorèse placée dans le sens de la migration sur le Pévikon. Après imbibition le papier est séché, la fine poussière de Pévikon qui adhère est enlevée. Ce témoin est alors coloré et décoloré comme une électrophorèse sur papier.

Le Pévikon correspondant aux diverses fractions ainsi révélées est découpé, lavé sur une petite colonne terminée par un verre fritté grâce à un volume d'éluant correspondant à 1,5 fois le volume occupé par le Pévikon : le rendement est alors toujours supérieur à 90 %.

GEL DE GELOSE : La gélose préparée suivant la technique indiquée pour l'immunoélectrophorèse est coulée dans une cuve à pont.

La fente d'inclusion se fait de la même façon que pour le Pévikon.

La solution à analyser est mélangée à parties égales avec de la gélose à 50° C et coulée dans la fente.

Après migration on découpe une bande de gélose que l'on colore comme un gel d'amidon. On découpe les fractions mises en évidence par ce témoin.

Les fractions sont mieux séparées qu'en Pévikon mais l'élution pose ici des problèmes plus complexes.

GEL D'AMIDON :

La technique de préparation des gels est la même que celle déjà étudiée.

L'inclusion est légèrement différente : la fente d'inclusion est plus large et plus longue (40 x 3 mm) ; chaque fente étant séparée de l'autre par 1,5 cm.

Après l'inclusion des lames porte-objet sont disposées sur les fentes pour les operculer ; cette précaution essentielle permet d'éviter toute ouverture de la fente sous l'effet de l'intensité du courant qui la traverse.

La migration se fait ensuite sous une différence de potentiel de 350 volts.

Sa durée dépend de la mobilité de la fraction que l'on veut purifier.

L'avantage de cette technique réside dans la finesse de la séparation, mais les difficultés rencontrées pour l'élution des fractions obtenues la rendent d'un rendement faible.

- L'élution : Si la technique qui utilise le Pévikon comme support ne pose pas de problème particulier au stade de l'élution, il en va tout différemment pour les techniques de gel de gélose et de gel d'amidon.

Après divers essais peu satisfaisants (congélation et décongélation successives suivies d'une expression à la seringue, élution au broyeur de FISCHER etc.....) La seule technique qui se soit révélée intéressante est l'ultracentrifugation à 150 000 g au minimum des fractions isolées ; pendant 1/4 heure pour la gélose et 1/2 heure pour le gel d'amidon.

Les résultats sont remarquables pour la gélose, les rendements étant de l'ordre de 80 %.

Pour le gel d'amidon ils sont moins bons : le rendement tombe à 50 % environ (ce qui est très acceptable pour le gel d'amidon) mais surtout il est impossible de se débarrasser en totalité de l'amidon : le liquide clair après l'ultra-centrifugation se trouble à nouveau après quelques heures : il y a vraisemblablement apparition d'amylopectines qui adsorbent une quantité non négligeable de protéines, diminuant le rendement à chaque nouvelle centrifugation.

Ce trouble présente des inconvénients importants :

- Il interdit toute analyse spectrophotométrique
- Il interdit toute analyse des glucides
- Enfin il gêne toute hydrolyse chlorydrique préalable à une analyse d'acides car il provoque un charbonnement.

Cette technique peut néanmoins être une étape importante du purification car elle sépare suivant des critères différents des autres techniques.

Nous expérimentons actuellement une colonne séparative en gel d'amidon avec recueil des fractions sur collecteur de fractions, mais notre expérience est encore très limitée bien que cette technique s'avère prometteuse. ^X

Cette expérimentation a été faite en collaboration avec MM. RICHARD et SILBERZHAN.

V LES METHODES ANALYTIQUES :

A ce stade de notre travail et compte tenu de la faible quantité de produits purs que nous avons pu préparer nous nous sommes limités dans ce premier temps à l'étude de la composition en acides aminés de chaque protéine.

a) Le tryptophane :

Les faibles quantités de produit nous ont interdit les méthodes chimiques.

X : L'appareil nous est dû à l'obligeance du Dr ORIOSO de Birmingham.

Aussi n'avons nous pu qu'exprimer des rapports molaires.

Pour le Tryptophanne nous avons calculé le rapport molaire Tyrosine sur tryptophanne en utilisant la formule de GOODWIN et MORTON telle qu'elle est proposée par BEAVEN et HOLIDAY.

$$\frac{M \text{ Tyr}}{M \text{ Try}} = \frac{0,592 D (2 \text{ 944}) - 0,263 D (2 \text{ 800})}{0,263 D (2 \text{ 800}) - 0,170 D (2 \text{ 944})}$$

"D" étant l'absorption du produit à la longueur d'onde en Angström indiquée dans la parenthèse, exprimée en densité optique. Cette mesure se fait après avoir amené la solution de protéines à un pH 12 par NaOH N/10.

Cette technique est basée sur le fait que les maximum d'absorption de la tyrosine et du tryptophanne sont parfaitement distincts dans NaOH N/10.

Cette méthode a l'avantage de ne consommer que très peu de produit.

b) Hydrolyse :

L'échantillon de protéine est introduit dans un tube en verre pyrex parfaitement propre. On ajoute une quantité déterminée de HCl 6N pour avoir toujours la même concentration en protéine (2 mg/ml en général).

Le tube est épaissi au chalumeau au 2/3 de sa hauteur et l'extrémité en est brûlée pour enlever le mordant du verre. Après refroidissement complet, on congèle alors dans un mélange acétone neige carbonique (15 minutes environ). On porte alors au dégazage sur une pompe à vide. Le mélange se congèle rapidement, et il se dégage quelques bulles de gaz dont on accélère l'élimination en frappant doucement sur la partie inférieure du tube. L'opération de dégazage demande 3 à 4 minutes au maximum. On ferme ensuite en dirigeant la flamme du chalumeau sur la partie épaissie du tube puis on laisse refroidir.

L'hydrolyse est ensuite conduite le temps désiré mais toujours à la même température constante de 105°C ou 110°C que l'on a choisie une fois pour toutes. L'hydrolyse terminée et le tube refroidi, on l'ouvre et verse le contenu dans un flacon à lyophiliser de 500 ml. On rince soigneusement le tube et amène l'hydrolysate à un volume tel que la concentration en HCl soit comprise entre 0,5 et 0,8 M.

Après congélation on lyophilise. Les lyophilisats sont conservés en chambre à -20°C pour éviter toute reprise d'eau avant usage et assurer ainsi une bonne conservation.

Les hydrolyses ont été réalisées par Y. MOSCHETTO, laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Médecine de Lille (Professeurs BOULANGER et BISERTE).

c) Dosage des Acides aminés:

Les hydrolysats sont étudiés par un analyseur.^X Les échantillons ont été passés successivement sur une colonne de résine de 15 cm en tampon citrate de pH 5,28 à 50°C qui sépare les amino-acides basiques, puis sur une colonne de 150 cm en tampon citrate pH 3,28 puis 4,25 à 50°C, dans le cas général.

X : Amino - Acides analyseur, modèle 120 Beckman.

Les chromatographies ont été réalisées par Monsieur COMTE, Institut du Cuir (Directeur : Professeur VALLET)

VI Ultra-Centrifugation

L'ultra-centrifugation a été réalisée à 58 780 trs/minute à 20°C. ^X

Deux systèmes optiques ont été utilisés :

1°) La méthode classique de la fente oblique de PHILPOT-SVENSSON (Schlieren-method)

2°) La technique par absorption dans l'ultra-violet à 2 780 Å. Cette deuxième technique permet l'utilisation de solutions protéiques dont les concentrations peuvent être inférieures à 20 µg/ml.

Chaque négatif obtenu est analysé à l'aide d'un microdensitomètre. Le tracé obtenu est une courbe en S qui correspond à l'intégrale de la courbe obtenue par la "Schlieren-method"

Grâce à l'usage de la bande de 2 780 Å il est possible de mettre en évidence 1 gradient de concentration dans une solution protéique.

Nous donnons dans le chapitre concernant l'étude de certaines protéines particulières des exemples de cette méthode.

Lorsqu'on a pu faire 3 essais, les résultats ont été extrapolés à concentration nulle. Il est à noter qu'avec cette méthode les concentrations de départ sont déjà très faibles : on travaille donc très près de la concentration nulle. Malheureusement, il est alors difficile d'apprécier une asymétrie dans la courbe densitométrique, si bien que l'on ne peut apprécier une hétérogénéité que si elle porte sur des poids moléculaires très différents. C'est pour cela qu'il est indispensable de faire précéder toute mesure par absorption en ultra-violet par un essai suivant la technique de SCHLIEREN qui seule donne un critère d'homogénéité.

Les ultra-centrifugations ont été faites à la station centrale d'ultra-centrifugation du C.N.R.S. (Paris) par Monsieur SAGAERT (Directeur Madame WURMSER).

VII Méthodes enzymatiques

Nous avons eu à utiliser l'action de la neuraminidase ^{XX} sur certaines de nos protéines. La neuraminidase est un enzyme qui détache l'acide sialique des glycoprotéines.

Elle se présente en flacons contenant 13 unités qui, reprises dans 2 ml de tampon donne une activité de 6,5 unités/ml.

A une solution de 2mg de protéines on ajoute 0,1 ml de solution, de neuraminidase.

La réaction enzymatique est faite en tampon phosphate 0,3M pH 7 pendant 16 heures dans un boyau de dialyse à 37°C. On dialyse ensuite contre du sérum physiologique à + 4°C pendant 24 heures.

X : Ultra - centrifugeuse analytique modèle E Beckman

XX : Neuraminidase de Vibrio - cholera Grade 3 SIGMA.

TABEAU I
ABREVIATIONS ET SYNONYMES DES PROTEINES
ETUDIES PAR NOS TECHNIQUES

Noms	Papier	Immuno	Amidon	Poids mol.	Slow	Point isoélectrique	Taux dans le sérum normal
Pré-albumine	Pré-alb	ρ	Pré alb. rapide	61 000	4,1 à 4,2		0,1 à 0,5 %
Albumine	Alb.	ALb.	Albumine	67 000	4,6	4,7	55 à 60 %
SM α		SM α1	Pré alb. lente	43 000	3,11	1,8 à 2,7	0,75 g°/∞
α1 3-5 glycoprotéine		α1	Albumine	54 000	3,41		0,30 g°/∞
α1 lipoprotéine	α1	α1lp	?	75 à 435 000	4,11 à 5,5		3,8 à
α2 légers de SCHMID		Ba α 2 Zn α 2	?	40 000 41 000	2,6 3,2		
Gc globulines		α 2	Post albumine	40 à 50 000			
Céruleoplasmine		α 2	Prefast α 2	151 000	7,1	4,4	0,30 g°/∞
α2 macroglobuline	α 2	α2 M	slow α 2	820 à 950 000	19,6	5,4	2,4 g°/∞
Haptoglobuline Hp 1-1		hapto	fast α 2	85 000	4	4,1	0,9 à 1,4 g°/∞
Haptoglobine Hp poly.		hapto	zone inter α-β	170 000	6,7		
β α 2 lipoprotéine			zone βlp	1 300 à 3 450 000	2,9 à 12		4 à 14 %
Sidérophiline	β1	β1 sidéro.	zone β c	88 000	5,0 à 6,1	5,9	2,5 à 3,5 g°/∞
Hémopexine		β1 B	entre βc et fast α2				
Complément C'3		β1 A et β1 C	en arrière de βc				
γ A	β 2	β2 A	zone β2A	160 000	7		1 g°/∞
γ M		β2 M	0	1 000 000	19 à 20		0,75 g°/∞
			et rapide	160 à 170 000	6,9 à 7	7,3	12 à 15 g°/∞

TABEAU II

Nomenclature adoptée	Abréviations	Principaux synonymes employés dans les travaux consultés
Préalbumine rapide	Pré Alb. rapide	Préalbumine riche en tryptophane, préalbumine ρ, p protéine riche en tryptophane.
Sérumoïde α1	SM α1	Orosomucoïde, sérumoïde acide, α1 - glycoprotéine acide, sérumoïde α1, fraction perchlorosoluble acide de SCHMID.
α1 3,5 glycoprotéine	α1 3,5 glycop.	α1 glycoprotéine 3,5 de SCHULTZE α1 principale, tryptosin inhibiteur glycoprotéin, anti-tryptine glycoprotéine, α1 A ?
α1 lipoprotéine	α1 lp	
Gc globulines	Gc	Group specific component (Gc 1-1, Gc 2-1, Gc 2-2) de HIRSCHFELD.
Haptoglobine monomère	Hp 1-1	Haptoglobine type I de Jayle, sérumoïde α2 léger.
Haptoglobine polymère	Hp - p	Haptoglobine type II de Jayle, H _p 2-1 et H _p 2-2.
α 2 macroglobuline	α2 M	Sérumoïde α 2 lourd, α2 glycoprotéine (SOOTHILL).
α 2 légers de SCHMID	Ba α2 Zn α2	α2 Ba glycoprotéines, α2 Zn glycoprotéine.
Céruleoplasmine		α2 globulin IV (HIRSCHFELD).
Sidérophiline	β sid.	β - sidérophiline, β - transferrine.
Hémopexine	β1B	Cytochromophiline β1 X (BISERTE), hémoglobine binding β1 globulin (HIRSCHFELD).
β1 A	β1 A	Sérumoïde β1 de BISERTE, ((complément)) (représente une forme du C'3 dans le sérum vieilli, apparaît en β1 C sur le sérum frais).
γ A globuline	γ A	γ1 γ1 A, Ig A, β2 A
γ M globuline	γ M	β 2 macroglobuline, γ1 M, Ig M, γ 19s.
γ G	γ G	γ normales, γ2, γ7s, Ig G.

N.B. - Pour les tableaux I et 2, l'ordre des fractions correspond à l'ordre des mobilités décroissantes en gélose avec le tampon que nous utilisons.

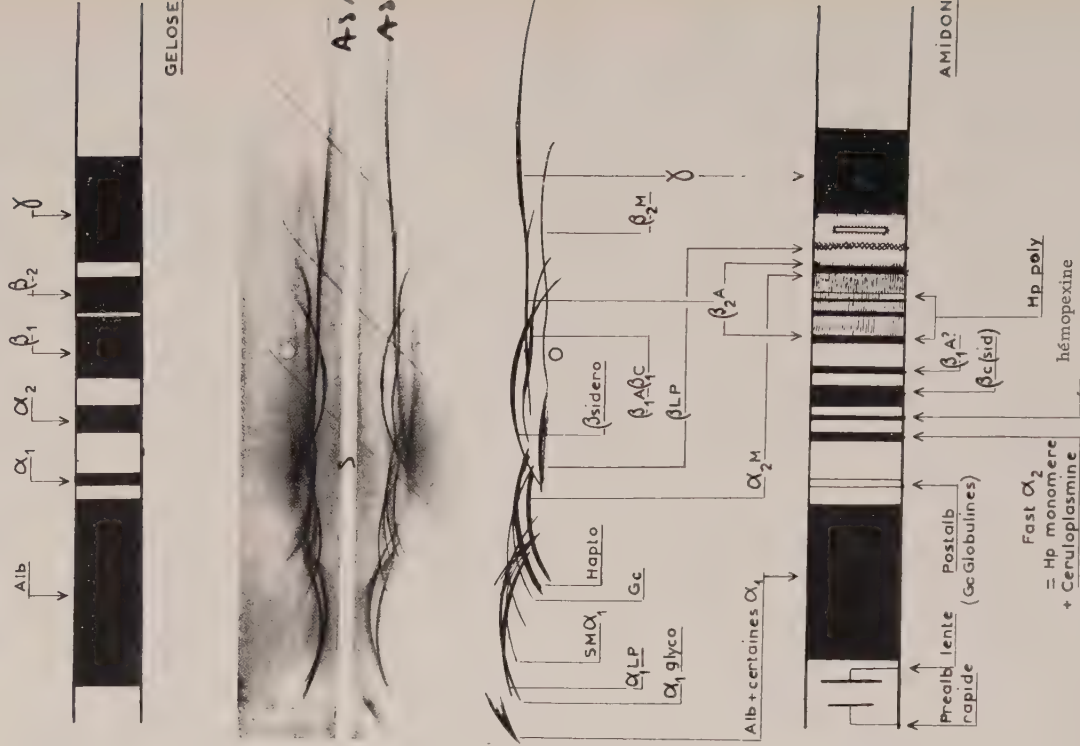


Figure 1. — Aspect du sérum humain normal en gélose, immuno-électrophorèse et gel d'amidon. (Cf. tableau 2)

ETUDE DESCRIPTIVE DE PROTEINOGRAMME DU L.C.R. HUMAIN NORMAL

I Electrophorèse sur papier

Les premiers auteurs qui ont étudié les protéines du liquide céphalorachidien par électrophorèse sur papier ou par électrophorèse en gel de gélose, se sont rendus compte très rapidement que les protéinogrammes étaient différents de ceux du sérum sanguin.

De nombreux travaux ont été faits à ce sujet, et il faut reconnaître que les résultats donnés par les divers auteurs sont assez souvent divergents : ils dépendent étroitement des méthodes utilisées, ainsi que de la qualité des liquides céphalorachidiens également utilisés. Il faut en effet redire ici combien il est difficile d'obtenir du liquide céphalorachidien normal, puisque le seul fait de prendre du liquide céphalorachidien chez l'Homme résulte d'une indication d'ordre thérapeutique.

Si l'on prend le liquide céphalorachidien de cadavre la fragilité de la barrière hémoméningée après la mort fait qu'il est pratiquement impossible d'obtenir du liquide céphalorachidien normal.

Nous essayerons dans cette partie de donner un aperçu aussi bref que possible sur les points actuels où se fait l'accord de presque tout les auteurs tant du point de vue qualitatif que quantitatif.

On trouve en effet, par électrophorèse sur papier, une première fraction de mobilité rapide, qui migre en position pré-albumine, une fraction albuminique, une fraction α -1-globuline toujours assez importante, une fraction α 2 globuline, une fraction β globuline, une fraction qui migre dans la zone des β 2 globulines, appelée communément par les auteurs, fraction "Tau", des traces à peine visibles dans la zone des γ globulines, et enfin, parfois, une ligne dans la zone des γ globulines lentes. Certains auteurs (LOWENTHAL)(14) ont décrit de nombreuses fractions dans la zone γ : fraction γ 1, γ 2, γ 3, surtout visibles d'ailleurs en gélose.

Données personnelles

Nous avons depuis longtemps commencé l'étude par électrophorèse sur papier des divers liquides céphalorachidiens normaux et pathologiques. Nous avons étudié environ 350 liquides céphalorachidiens que l'on peut considérer comme normaux et 1 300 qui sont nettement pathologiques. A ceci, il faut ajouter des mélanges de L.C.R. provenant de cadavres. Nous n'étudierons ici que la composition des li-

quides céphalorachidiens normaux et des liquides céphalorachidiens de cadavres.

Le liquide céphalorachidien normal

Les valeurs que nous allons donner représentent des pourcentages de protéines totales de ces liquides céphalorachidiens. Ces pourcentages nous donnent une valeur minimum et une valeur maximum. Etant donné la faible précision de la détermination de ces pourcentages par électrophorèse sur papier il nous a semblé inutile de donner des valeurs plus précises.

La pré-albumine

Le taux de pré-albumine est toujours très important : il peut varier entre 4 et 6 % dans les liquides normaux ; ces chiffres sont évidemment valables dans les conditions où nous travaillons. Le taux de pré-albumine est légèrement plus élevé dans les liquides ventriculaires que dans les liquides d'origine lombaire. D'autre part, dans les cas de non communication totale ou partielle entre les ventricules et les espaces sous-arachnoïdiens, il peut y avoir une augmentation plus considérable de la pré-albumine qui peut atteindre 8 et même 10 % des protéines totales ; nous reviendrons plus loin sur cette notion importante.

L'albumine

Le taux de l'albumine est variable mais toujours égal ou supérieur au taux des globulines : entre 50 et 60 % des protéines totales. Sa mobilité semble plus importante que celle du sérum.

Les α 1 globulines

Les α 1 globulines sont toujours proportionnellement plus importantes que dans le sérum sanguin. Leur taux varie entre 6 et 10 % dans notre étude. Leur bande en est généralement homogène.

Les α 2 globulines

Les α 2 globulines sont rarement en quantité plus importante que les α 1 globulines, et souvent en quantité inférieure. Nous trouvons entre 4 et 8 % d' α 2 globulines. Très souvent, la mobilité des α 2 globulines est inférieure à la mobilité des α 2 globulines sériques. Enfin, elles sont assez étalées par rapport à celles du sérum et présentent quelquefois 2 bandes séparées. Elles semblent en effet beaucoup moins homogènes que les α 2 sériques. Une caractéristique apparaît immédiatement : c'est la modification du rapport α 1 sur α 2 dans le liquide céphalorachidien par comparaison au sérum : en effet, le rapport α 1 sur α 2

dans le sérum est de l'ordre de $1/2$, alors que dans le liquide céphalorachidien, il est de l'ordre de 1 environ. Il faut signaler que dans une filtration sélective telle que l'on peut la voir dans des protéinuries, le rapport est complètement inversé et égal à 2. Nous reviendrons sur ce point plus tard.

Les β globulines

Les β globulines ont tout de suite attiré l'attention des auteurs par l'aspect toujours visible, avec une bonne technique de séparation en papier et avec n'importe quelle technique en gélose, d'une deuxième bande très bien définie, migrant dans la zone des β 2. La ligne β normale correspondant à la β sérique, se trouve relativement dans la même proportion que dans le sérum, c'est à dire entre 10 et 15 %. La deuxième bande se trouve dans des proportions inférieures à la première et toujours supérieures à la bande β 2 sérique, variant entre 5 et 10 % suivant les cas. Cette deuxième fraction a une mobilité légèrement inférieure à la bande β 2 sérique, et si cette différence de mobilité est peu importante, elle est toutefois extrêmement nette et se retrouve régulièrement, ce qui nous a fait penser au début de notre étude de qu'elle était différente de la β 2 sérique.

Les γ globulines

Le taux des γ globulines est très difficile à apprécier : en effet, les petits taux de protéines sont très difficiles à chiffrer en électrophorèses sur papier, parce que la précision de la lecture par un lecteur à extinction par exemple, fait très mal la différence entre de petits taux protéiques et des irrégularités de décoloration qui sont inévitables. Quoiqu'il en soit, on peut affirmer qu'un taux normal de γ globulines est toujours inférieur à 8 % environ. Certains auteurs parlent de 2 à 4 %. Nous pensons que ces valeurs sont un peu basses et qu'il faut s'en tenir à un taux compris entre 6 et 8 % de γ globulines, ce qui est très faible.

Enfin, dans la zone lente, on peut quelquefois voir une ligne " post γ " globulinique, toujours assez mal visible sur papier, alors qu'en gélose, elle l'est beaucoup mieux. Sa faible importance se prête mal à une estimation quantitative sur papier et nous la faisons rentrer dans les pourcentages de γ globulines indiquées ci-dessus.

Le liquide céphalorachidien de cadavre

Les seules différences avec le liquide céphalorachidien normal, se résument en 2 points :

- le rapport α 1 sur α 2 tend à se rapprocher de celui du sérum
- les γ globulines sont très augmentées par rapport au liquide céphalorachidien normal.

II Etude immunoélectrique

De très nombreux auteurs ont étudié par immunoélectrophorèse le liquide céphalorachidien. Les premiers l'ont étudié avec des immunsérums standards : puis récemment avec des immunsérums spéciaux anti-liquide céphalorachidien. Enfin, des études comparatives ont été faites avec divers immunsérums de diverses origines : immunsérums anti-organes, immunsérums anti-urines.

Nous envisagerons dans ce chapitre la description et la signification des tracés immunoélectrophorétiques, ce qui nous permettra d'identifier au fur et à mesure les fractions protéiques rencontrées, et de les comparer aux fractions sériques correspondantes.

Nous discuterons nos résultats en fonction de ceux de la littérature.

Nous suivrons pour cette étude l'ordre de l'électrophorèse simple en gélose en allant de l'anode vers la cathode.

Fraction pré-albuminique

Immunsérums standards : ils ne révèlent pas la pré-albumine sérique, donc ne peuvent révéler cette région.

Immunsérums anti-LCR : ils révèlent une ligne importante correspondant à la pré-albumine déjà décrite par électrophorèse sur papier. Mais ils révèlent aussi une pré-albumine dans la plupart des sérums étudiés, quoique par une ligne de précipitation beaucoup moins intense. Ce fait a une valeur car nos immunsérums de Lapin sont moins sensibles au rapport antigène-anticorps.

Immunsérums anti-pré-albumine sérique : Ils révèlent parfaitement la pré-albumine du LCR.

Immunsérum anti-LCR :

Enfin, si l'on révèle la pré-albumine sérique par un immunsérum anti-LCR, parallèlement à la pré-albumine du LCR par un immunsérum anti-pré-albumine sérique, les lignes de précipitation obtenues se fusionnent ce qui prouve leur identité immunologique.

Une préparation pure de pré-albumine de LCR n'est plus révélée par un immunsérum anti-LCR épuisé par du sérum humain. Ceci prouve qu'il n'y a pas de motifs antigéniques particuliers et supplémentaires dans la pré-albumine du LCR par rapport à son homologue sérique et démontre son homogénéité, tout au moins sur le plan immunologique.

Ces résultats sont en accord avec les travaux de FRICK (14) qui, en 1960 établissait l'identité immunologique de ces deux pré-albumines.

L'albumine

La fraction albumine ne pose pas de problèmes d'identification particuliers. Toutefois, nous lui avons fréquemment trouvé une mobilité légèrement augmentée dans le LCR par rapport au sérum.

Certains auteurs le signalent également, LOWENTHAL en particulier (15).

Le Groupe des α 1 globulines

Nous avons personnellement identifié 2 fractions avec certitude dans le LCR :

L' α 1 lipoprotéine : elle est visible à l'aide de nos immunsérums standards dès que la concentration en protéines du LCR étudié est supérieure à 30 g/‰. Or, ces résultats sont identiques pour le sérum : une dilution au demi laisse encore visible cette protéine qui n'est plus révélée par une dilution au quart.

Il semble donc que, relativement au sérum, cette protéine se trouve en quantité légèrement inférieure dans le LCR.

Dès 1953 BAUDOUIN, par électrophorèse sur papier révélait cette différence. DENCKER et SWAHN (16) ont discuté la possibilité d'une hétérogénéité de cette fraction dans le LCR, mais l'homogénéité de la ligne de précipitation en immunoélectrophorèse, et surtout la très grande variabilité de sa mobilité qui peut aller de la mobilité de la pré-albumine à la mobilité de l' α 1 globuline, expliquent parfaitement cette apparence d'hétérogénéité.

L' α 1 principale : (α 3,5 glycoprotéine), isolée par SCHULTZE (17), elle se comporte comme un inhibiteur de la trypsine, d'où son nom d' α 1 antitrypsine.

Nous l'avons toujours trouvée comme un composant majeur des α 1 du LCR.

Par la technique de la "fente courte" (LEVY et POLONOVSKY) nous avons pu l'identifier avec certitude dans un travail qui a fait l'objet de notre thèse de Médecine (18).

Sa ligne de précipitation est toujours très intense.

Le séromucoïde α 1 : le problème s'est révélé difficile à aborder car les flots d'immunsérums dont nous disposions révélaient mal cette glycoprotéine : sa ligne de précipitation dans le sérum était toujours très faible. Or, nous ne la trouvions jamais dans les liquides céphalorachidiens normaux étudiés, tout au moins aux concentrations auxquelles nous travaillons (30 g/‰). Or, à ces mêmes concentrations cette protéine donnait encore une ligne de précipitation visible avec du sérum.

Par ailleurs, nous avons remarqué qu'excepté dans certaines conditions pathologiques, nous ne trouvions jamais à ces concentrations de pré-albumine lente en électrophorèse en gel d'amidon comme nous le verrons plus loin. Il fallait travailler à des concentrations identiques à celle du sérum normal, pour voir apparaître une ligne d'intensité toujours inférieure à celle du sérum.

Ces résultats sont en accord avec ceux de GOODMAN et VULPE (19), qui trouvent dans le LCR des quantités de séromucoïde α 1 représentant 0,7 % des protéines totales du LCR contre 1 % des protéines totales dans le sérum. Ceci est d'autant plus important que les α 1 globales sont, en valeur relative, plus importantes dans le LCR que dans le sérum.

Ces résultats sont pourtant contestés par LATERRE (20) qui n'a toute-

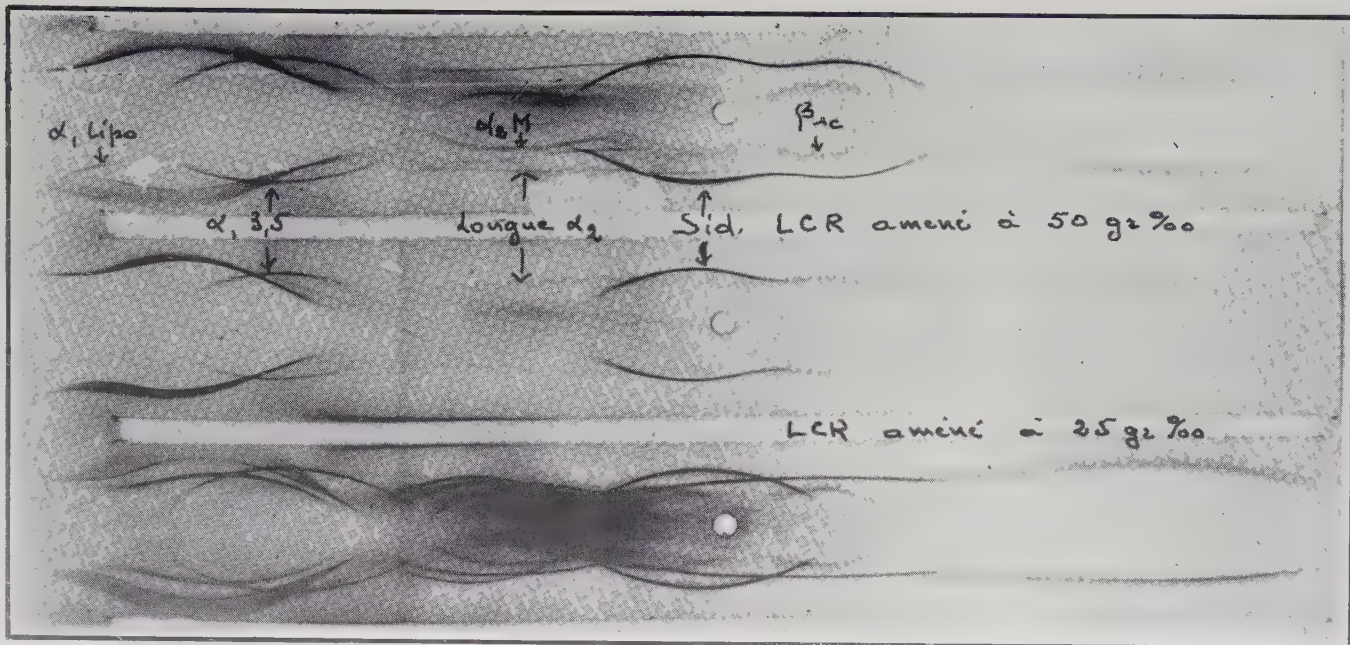
PLANCHE N° 5

Fig 1 :

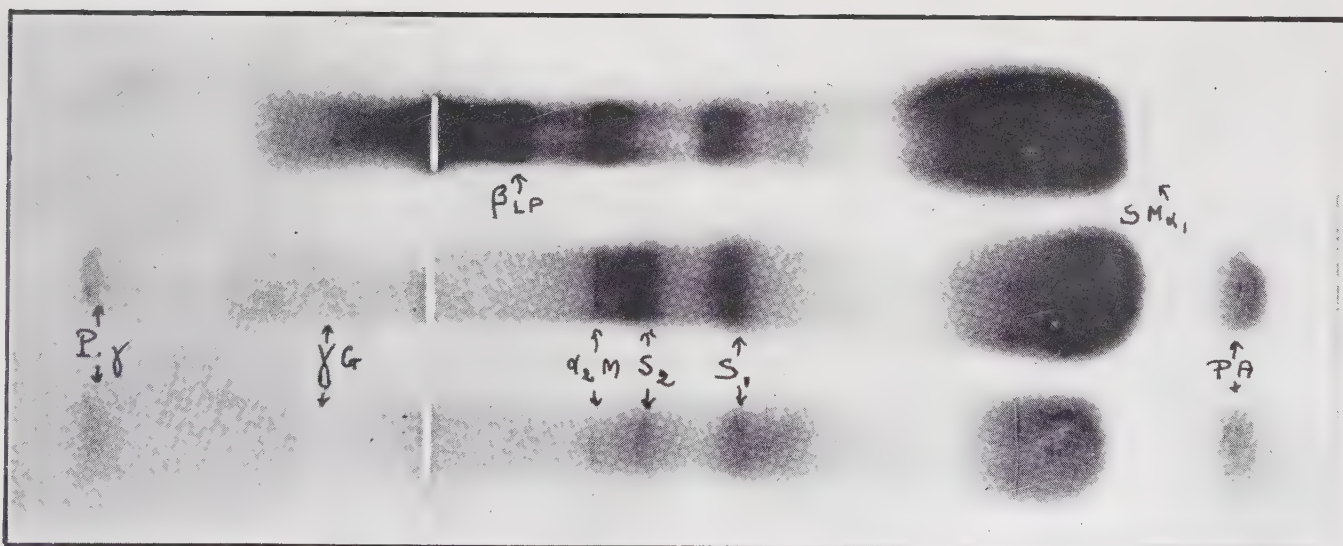
Immunoélectrophorèse comparative de 2 L.C.R. et d'un sérum normal.
Les 2 LCR sont à des concentrations différentes : respectivement 50 et 25 g °/∞. Immunsérum standard antisérum humain.

Fig 2 :

Electrophorèse en gel d'amidon des mêmes L.C.R. et d'un sérum normal
(cuve standard)



1



2

fois pas utilisé le gel d'amidon qui donne un critère d'identification très précis pour ce constituant.

Le groupe des α 2 globulines

La ligne longue α 2 : Nous trouvons fréquemment une ligne très allongée, diffusant très rapidement et donc très rapprochée de la rigole de l'immunsérum, et éloignée de l'axe de migration. Cette ligne a une morphologie très proche de celle décrite par BERGGARD dans les urines et qui correspond, dans le sérum, à une protéine que SCHULTZE a pu isoler et qu'il a nommée α 2 HS (21).

LATERRE, (22) par la technique de l'immunsérum épuisé a pu démontrer leur identité immunologique.

Haptoglobines : Nous ne trouvons, aux concentrations auxquelles nous travaillons, que rarement une ligne qui donne la réaction à la benzine, après saturation en hémoglobine. Toutefois il est possible, qu'à forte concentration, on puisse mettre en évidence, comme l'a fait BLAU (1963) (23) les divers types d'haptoglobines (HpI-I, Hp2-2, Hp2-1).

Quoiqu'il en soit, il est permis d'affirmer que cette protéine ne se trouve qu'à l'état de traces dans le LCR, alors qu'on la trouve toujours en grande quantité dans le sérum. Ce fait est d'autant plus remarquable que le poids moléculaire du groupe HpI-I est très voisin de celui de la sidérophiline qui se trouve, elle, en grande quantité dans le LCR. Nous discuterons ce point dans le chapitre consacré aux origines des protéines dans le liquide céphalorachidien.

La céruléoplasmine : Nous n'avons pu la caractériser directement par la réaction qui lui est spécifique (coloration à la paraphénylène diamine) car toutes nos préparations sont conservées avec de l'azothydrate de sodium, corps qui inhibe la réaction enzymatique à la base de la coloration spécifique.

Toutefois, par épuisement d'un immunsérum standard par une solution de céruléoplasmine pure, on voit disparaître dans le LCR une ligne en position α 2 rapide, identique à celle que l'on voit disparaître dans le sérum, mais il faut opérer à de très fortes concentrations.

Si Burtin ne la trouve pas dans le LCR, les autres auteurs (CLAUSEN, JENSEN, GOODMAN et VULPE) l'identifient sans aucun doute, mais la trouve en quantité plus faible que dans le sérum, comme le montre également LATERRE.

L' α 2 macroglobuline : Nous trouvons toujours une ligne, correspondant à une faible diffusion, donc à un poids moléculaire élevé, qui avait la même morphologie que celle donnée par l' α 2 M dans le sérum. Ce point nous avait déjà étonnés dans notre thèse de Médecine (1962)

Par des immunsérums spécifiques et par électrophorèse en gel d'amidon, il nous a été possible de démontrer son existence à des taux inférieurs de deux tiers environ à ceux rencontrés dans le sérum, taux exprimées en pourcentage de protéines totales. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par FRICK, ROSENTHAL et SOOTHIL, DENCKER (25).

Le groupe des β globulines

Les sidérophilines (transferrines) : Dès le début de cette étude (1959), nous avons été frappé par l'aspect de la ligne de précipitation correspondant à la sidérophiline : c'était celui d'une ligne à double courbure caractéristique, double courbure que nous ne rencontrons dans aucun des autres liquides que nous avons pu étudier alors (le liquide sous-rétinien, urines de syndromes néphrotiques, humeur vitrée en première approximation).

Il nous a été facile de faire le rapprochement avec le composant "tau" décrit sur papier. Mais seules les expériences avec fixation de Fer radioactif nous en ont apporté la preuve indiscutable. Ceci s'est trouvé confirmé par l'analogie que nous démontrons plus loin entre la deuxième sidérophiline trouvée en gel d'amidon et le composant "tau" sur papier.

Il est à noter que c'est seulement en 1959 que BURTIN identifia cette ligne à la sidérophiline, et en 1961 que CLAUSEN et MUNKER (26) notaient comme identique la capacité de fixation de ^{59}Fe de la sidérophiline et de la fraction "tau".

La β 1 A globuline : nous trouvons souvent à des concentrations peu importantes (20 g°/oo), une ligne qui, en immunoélectrophorèse migrerait soit en position β 1, soit en position β 2, en position intermédiaire avec une double courbure, quoique avec un coefficient de diffusion en gélose très inférieur à celui de la sidérophiline. Cet aspect correspondait à celui de la β 1 A-1 C dont la mobilité croît en fonction du vieillissement dans le sérum (cette ligne correspond à un élément du complément élément labile qui complète l'interaction de certains anticorps avec certains antigènes. Nous avons confirmé ces observations par l'emploi d'un immunosérum spécifique. Elle a d'ailleurs été formellement identifiée en 1960 par CLAUSEN et BAMMER (1963) (27).

Le groupe des γ globulines

Nous n'avons jamais trouvé, même à des concentrations voisines de celles du sérum, des traces de γ A et γ M globulines.

Toutefois, par des méthodes indirectes, BURTIN, puis CLAUSEN, pensent à la présence, mais à l'état de traces seulement de la γ A. (28).

Nous verrons que dans certains cas pathologiques ces protéines peuvent apparaître dans le LCR indépendamment du sérum sanguin correspondant.

Les γ globulines (γ G) : Elles sont toujours présentes mais en quantité inférieure en pourcentage avec un sérum normal, comme nous l'avons déjà souligné par analyse sur support papier.

Les "post γ globulines" Elles ne sont pas révélées par nos immunosérums. Toutefois nous les révélons parfaitement avec un immunosérum anti-LCR de Chèvre qui nous a été obligeamment fourni par le Dr LATERRE.

Nous retrouvons de façon indiscutable une ligne de précipitation en position γ rapide, (β 2). Les deux stades sont souvent visibles donnant alors une

PLANCHE 6



1



2

ligne à double courbure caractéristique. Il est à noter que sa diffusion est importante, les lignes de précipitation étant très proches de la rigole d'immunsérum, nous étudierons cette protéine en détail, plus loin.

L'étude immunologique de ce composant, ainsi que d'autres composants spécifiques du LCR a été très poussée par Mac PHERSON (1961), HOCHWALD et THORBECKE (1962) et surtout LATERRÉ et HEREMANS (1963-1964) (29), qui décrivent 9 fractions révélées par leurs immunsérums anti-LCR, après épuisement par du sérum normal, dont la "post- γ ", qu'ils appellent dans leur dernière nomenclature " δ a T'".

D'autres auteurs; GALLI (1962), FRICK (1962), ROSENTHAL et SOOTHILL (1962) (30), n'ont pas réussi à obtenir des immunsérums anti-LCR qui révèlent ces lignes spécifiques. Nous avons eu les mêmes difficultés qui tiennent, quant à nous, au trop petit nombre d'animaux que nous pouvions immuniser par lots.

PLANCHE N° 6

Fig 1 :

Identification de l' α_1 antitrypsine par la technique des "fentes courtes"

Fig 2 :

Identification des différentes lignes de précipitation dans un L.C.R. normal concentré à 20 g °/∞ par l'utilisation d'immunsérums spécifiques.

III Electrophorèse en gel d'amidon

Très rapidement, à la suite de notre étude sur le liquide sous-rétinien nous avons, dès 1959, commencé à étudier le liquide céphalorachidien par la technique de l'électrophorèse en gel d'amidon. A notre connaissance, une seule autre équipe, celle de PERT et KUTT a étudié le liquide céphalorachidien par cette technique (1958-1960) (31).

Résultats personnels

Nous étudierons les résultats obtenus par électrophorèse en gel d'amidon (tampon continu borate-borate).

Pour cette étude, nous adopterons la nomenclature de SMITHIES. Nous appellerons pré-albumine rapide, celle qui correspond à la pré-albumine riche en tryptophane, pré-albumine lente celle qui correspond en amidon à l'orosomucoïde α_1 . Enfin, nous appellerons "post γ " globulines, les fractions globuliniques lentes qui migrent en arrière des fractions γ globulines normales.

a) LCR normal :

De l'anode vers la cathode, nous avons trouvé en gel d'amidon :

- une fraction correspondant à la pré-albumine rapide quoique de mobilité légèrement supérieure à la pré-albumine sérique correspondante. Elle est en quantité toujours très importante alors qu'on ne la trouve qu'à l'état de trace dans un sérum normal. Elle correspond ici à un taux loin d'être négligeable, puisqu'elle représente entre 5 et 10 % de la fraction albuminique.
- l'albumine.
- une zone de coloration légèrement diffuse dans la zone "fast α_2 " globulines et peu homogène.
- une ligne toujours importante dans la zone β_c de SMITHIES accompagnée souvent d'une deuxième ligne.
- une ligne dans la zone "slow α_2 " de SMITHIES toujours présente et toujours très nette.
- entre la zone "slow α_2 " et β_c , nous avons trouvé régulièrement, et en quantité presque équivalente à la fraction β_c , une ligne que nous avons appelée "inter $\alpha - \beta$ ".
- nous ne trouvons jamais rien dans la zone β_{lp} de SMITHIES ainsi que dans la zone γ globulines, en arrière de la fente d'inclusion.
- mais, dans la zone que nous avons appelée "post γ " globulines, nous trouvons toujours un composant très net, très bien différencié, très homogène, correspondant à une protéine non dénaturée que nous avons appelée "post γ lente" ou post γ .

b) Le liquide céphalorachidien de cadavre.

Outre ces fractions, dans le liquide céphalorachidien de cadavre, nous

voyons apparaître en plus une pré-albumine lente et ceci dès la troisième heure après le décès, une ligne très nette dans la zone "fast α 2" ainsi qu'une ligne post-albumine, des lignes haptoglobines dans la zone haptoglobine de SMITHIES et toujours une ligne dans la zone des β lipoprotéines. En fond, entourant la zone "slow α 2" apparaissait une zone protéique qui correspondait aux γ A globulines, alors que les γ G globulines apparaissaient cette fois-ci très nettement.

Enfin, les "post γ " globulines restaient toujours présentes, mais apparaissait souvent après quelques jours de conservation, une "post γ " ayant une mobilité intermédiaire entre la "post γ " précédente et les γ globulines G. Cette ligne que nous avons appelée "post γ intermédiaire", se situait à la limite cathodique des γ globulines en gel d'amidon.

Nous avons ensuite essayé d'établir les corrélations existant entre les tracés électrophorétiques en gel d'amidon et les électrophorèses habituelles.

IV Electrophorèse bidimensionnelle : papier, gélose, gel d'amidon :

Par électrophorèse bidimensionnelle, suivant la technique que nous avons décrite, nous avons pu voir que la pré-albumine rapide correspondait effectivement à la pré-albumine rapide du sérum. La pré-albumine lente trouvée dans le liquide céphalorachidien de cadavre, correspondait effectivement au sérumucoïde α 1.

La fraction albuminique antérieure correspondait à l'albumine, la fraction postérieure comprenant une autre α 1, l' α 1-3,5-antitrypsine.

Dans la zone "fast α 2", nous retrouvions la céruloplasmine, l'haptoglobine monomère (Hp 1-1) et la ligne que nous avons appelée "longue α 2".

La zone β_c correspondait à la transferrine et à la zone β 1 A.

Le composant "inter α - β " nous posait un problème que nous avons élucidé par cette première approche : en effet, il existe dans le sérum normal un composant particulièrement important chez la femme gestante, que certains auteurs ont appelé "protéine gestante" et qui, d'après nos premières études semblait appartenir à l' α 2 macro-globuline, migrant donc en zone α 2 en gélose.

Par électrophorèse bidimensionnelle, le composant "inter α - β " du liquide céphalorachidien lui, migrerait dans la zone de la fraction "Tau", c'est à dire en zone β 2, ce qui était donc fondamentalement différent.

Par diffusion intermédiaire sur plaque de gélose, on voyait apparaître une ligne de précipitation à double courbure montrant la parenté immunologique entre le composant "inter α - β " et la transferrine de la zone " β_c ". Ce composant correspondait donc à la deuxième transferrine du liquide céphalorachidien, sur laquelle nous reviendrons plus loin. Les travaux de PARKER et BEARN (32) ont également confirmé ceci.

Enfin les "post γ " globulines correspondaient soit à la "post γ " trouvée en gélose, soit à une ligne migrant dans la zone β 2. Nous ne nous sommes pas expliqué ce fait au début de notre étude mais nous nous sommes aperçus que c'était la "post γ " intermédiaire qui migrerait en zone β 2 alors que la vraie "post γ " migrerait toujours en position post γ . Ce dernier point nous a été expliqué par les travaux de HOCHWALD et THORBECKE puis par ceux de LATERRE et HEREMANS (33) montrant

que la conservation modifiait la mobilité de la "post - γ " en gélose, lui conférant une mobilité pouvant atteindre celle de la zone β 2.

En gel d'amidon, nous n'avons jamais vu cette mobilité dépasser celle de la "post γ " intermédiaire que nous avons décrite.

A ce stade de notre étude il nous était possible de déterminer ce qui faisait l'originalité du LCR par rapport au sérum sanguin.

1 : Présence en quantités considérables de pré-albumine riche en tryptophane; de petites différences de mobilité avec celle du sérum sanguin nous obligeait à vérifier son identité avec la pré-albumine sérique. Ces différences de mobilité en gel d'amidon pouvait aussi être expliquées par un rapport albumine/ pré - albumine différent.

2 : La deuxième sidérophiline nous posait un problème sur ses rapports avec la première sidérophiline et son origine.

3 : les "post - γ " globulines enfin nous étaient totalement inconnues et personne jusqu'à présent n'avait réussi à les purifier de façon satisfaisante. Il nous fallait donc mettre au point des méthodes de purification pour ces différentes fractions et nous en permettre l'étude.

Ces méthodes faisant appel en premier à la gel filtration, nous étudierons d'abord l'aspect du LCR après gel-filtration sur Séphadex G 200.

PLANCHE N° 7

Etude par électrophorèse bidimensionnelle d'un sérum normal.

Fig 1 :

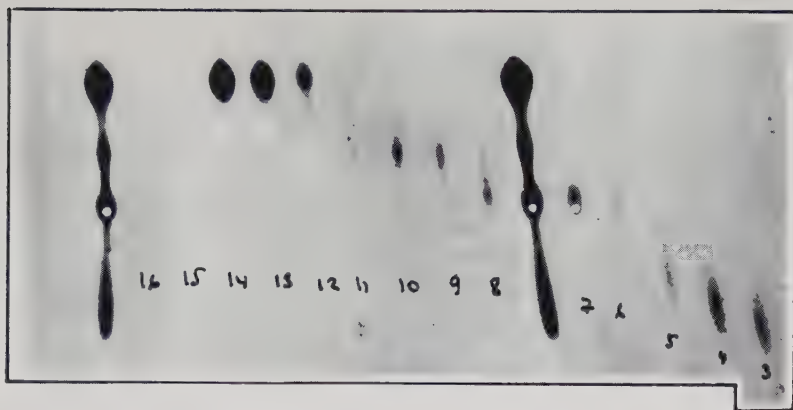
Electrophorèse en gélose des fractions éluées à partir de l'électrophorèse préparative sur papier.

Fig 2 :

Immuno-électrophorèse des mêmes fractions.

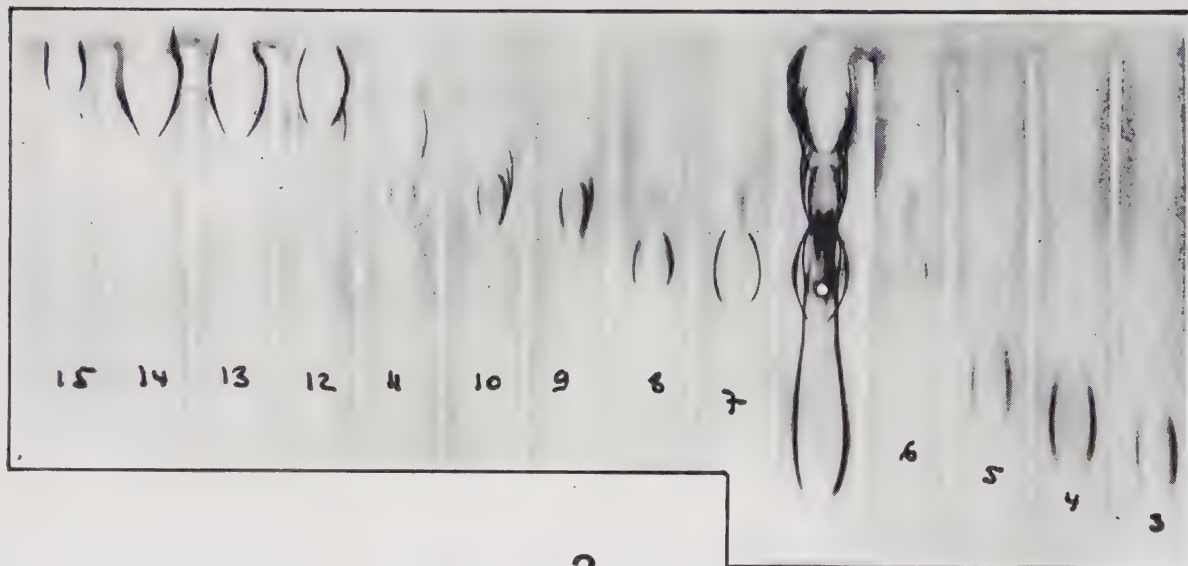
Fig 3 .

Electrophorèse en gel d'amidon : la ligne "inter α - β " se situe dans la fraction 11 qui correspond à une zone α 2. La sidérophiline est éluee dans les fractions 6, 7, 8.

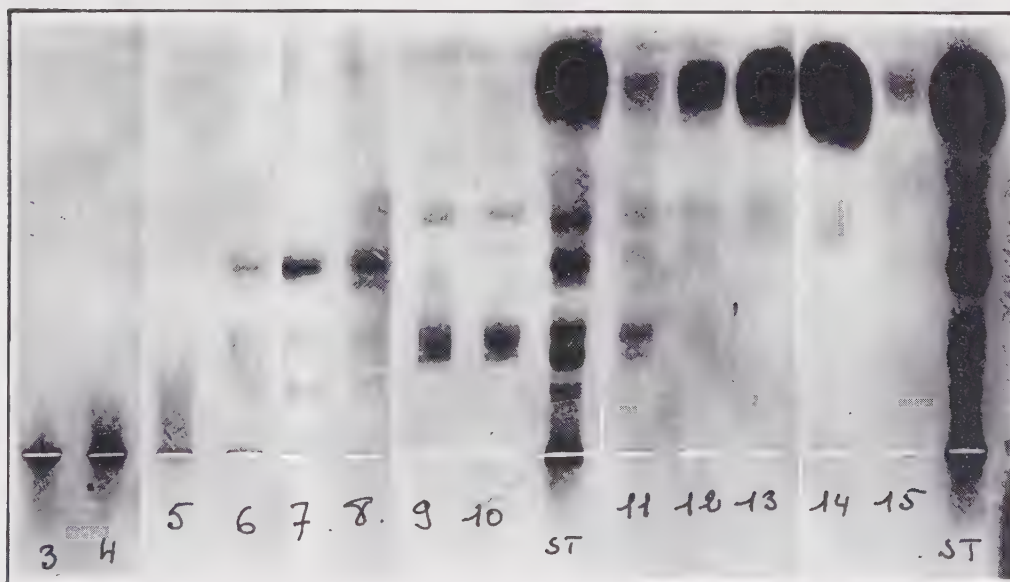


SERUM

1



2



3

PLANCHE N° 8

Etude par électrophorèse bidimensionnelle d'un LCR de cadavre :

Fig 1 :

Electrophorèse en gel de gélose des fractions éluées à partir de l'électrophorèse sur papier.

Fig 2 :

Immuno-électrophorèse des mêmes fractions. On note l'amorce d'une double courbure dans les lignes des fractions 6 et 7.

Fig 3

Electrophorèse en gel d'amidon : la ligne "inter α β " se situent dans les fractions 5, 6 et 7 qui correspondent à une zone " β 2". La sidérophiline est éluee dans les fractions 6, 7 et 8.

V : Application de la gel filtration à l'étude du liquide céphalorachidien normal :

Pour des raisons de quantité de liquide nous avons étudié le liquide céphalorachidien provenant de cadavres si bien que les résultats que nous rapportons ne peuvent être extrapolés au LCR normal que pour les fractions qui ont été identifiées comme étant spécifiques de ce liquide.

Les résultats sont exposés en entier dans la planche 9. On remarque que la pré-albumine caractéristique, les transferrines sont éluées en même temps que l'albumine. Mais le fait important est que la "post- γ " caractéristique est par contre élue dans les fractions terminales. Nous avons en effet groupé en 6 fractions les 90 tubes provenant de l'élution.

Si on procède à l'étude d'un sérum normal par gel filtration on s'aperçoit d'une différence fondamentale avec le tracé obtenu pour le liquide céphalorachidien : elle porte essentiellement sur l'apparition d'un pic d'élution qui suit celui qui correspond aux transferrines, à l'albumine et aux pré-albumines. Ce pic n'est jamais présent dans le sérum normal. Il existe dans le sérum des protéines de poids moléculaire plus faible que celui de l'albumine mais pour des raisons que nous n'expliquons pas, ces protéines ne sont pratiquement pas dissociées du pic d'élution de l'albumine, formant à l'extrême limite une légère asymétrie dans ce pic. Or dans le cas du LCR il ne s'agit pas d'une asymétrie mais d'un véritable pic s'éluant après celui de l'albumine et parfois très distinct.

Dans le pic d'élution de l'albumine nous trouvons comme nous l'avons dit 2 fractions importantes du LCR : la pré-albumine et la transferrine ; mais dans le pic qui sort après celui de l'albumine nous trouvons un grand nombre de fractions qui sont d'un intérêt considérable.

1 : les "post γ " globulines : normales et intermédiaires que nous avons décrites plus haut se retrouvent très exactement dans cette fraction en dehors de la présence de toute γ globuline qui a été élue dans les fractions précédentes.

2 : Nous trouvons ensuite dans la zone β_c et la zone post-albumine du gel d'amidon des fractions également caractéristiques que nous ne trouvons jamais dans le sérum normal. Nous verrons plus loin que nous trouvons les mêmes fractions dans certaines protéinuries.

Dans les éluats de tête nous trouvons de nombreuses fractions qui ne sont pas dans le LCR : ceci provient du fait que nous avons utilisé du LCR de cadavre.

L'étude ainsi faite par gel filtration nous permettait de concevoir la possibilité d'une préparation et d'une purification de ces protéines en utilisant des fractions éluées après gel filtration. En effet des protéines qui semblaient propres au LCR apparaissaient en assez grand nombre dans les fractions éluées après l'albumine. A cette première conséquence s'en ajoutait une seconde : ce fait nous permettait de supposer que ces fractions caractéristiques étaient vraisemblablement des fractions de faible poids moléculaire puisqu'elles étaient éluées encore après l'albumine.

C'est à partir de ces résultats que nous avons mis au point nos procédés d'isolement et de purification.

ISOLEMENT ET PURIFICATION DES PROTEINES SPECIFIQUES DU LIQUIDE CEPHALORACHIDIEN.

Méthodes de purification de ces diverses protéines :

De tout ce que nous venons d'étudier il apparait nettement que 3 composants semblent spécifiques du LCR :

- le premier par les quantités anormales dans lequel on le trouve : la pré-albumine.

- les deux autres par le fait que nous ne les rencontrons jamais dans un sérum normal : la deuxième transferrine et la "post- γ " globuline .

Il nous a donc semblé intéressant de séparer ces 3 fractions pour les étudier isolément.

Mais quelques remarques importantes doivent être faites :

Lorsqu'on étudie des γ globulines sériques préparées par la technique de COHN et concentrées à des taux voisins de 150 g°/oo, on a la surprise de trouver une ligne qui rappelle celle de la "post- γ ".

Lorsqu'on fractionne par DEAE cellulose de la sidérophiline il arrive parfois que l'on voit apparaître des fragments de sidérophiline qui ont une constante de sédimentation inférieure à celle de la sidérophiline normale, ou qui ont une mobilité modifiée : cette anomalie est surtout visible chez les sidérophilines de poissons qui semblent particulièrement fragiles.

Lorsqu'on prépare de la γ A pathologique, homogène en gel d'amidon, par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium, elle devient après préparation hétérogène en gel d'amidon (RICHARD) (34).

Ces quelques raisons nous ont conduit à proposer des méthodes qui ne fassent appel à aucune réaction de précipitation qui si douce soit elle modifie l'équilibre électrique des protéines pour éviter toute dénaturation en cours de séparation.

Nous avons également essayé d'éviter toute chromatographie par résine échangeuse d'ions qui modifie aussi l'équilibre électrique des protéines. En effet toute préparation nécessite plusieurs purifications intermédiaires et si les protéines résistent à 1 ou 2 purifications, dès la troisième elles commencent à se dénaturer. Nous avons donc utilisé 2 méthodes couplées à l'exclusion de toute autre : la gel filtration sur Séphadex G 200 et l'électrophorèse préparative.

Gel filtration sur Séphadex G 200 :

Comme nous l'avons décrit la gel filtration fait apparaître 5 ou 6 pics d'élutions dans le LCR de cadavre.

4 de ces pics correspondent à ceux trouvés normalement dans le sérum : macroglobulines, γ -globulines et haptoglobulines, albumine sidérophiline.

2 ne se trouvent que dans le LCR et correspondent aux diverses fractions post- γ et β que nous avons déjà décrites.

Parallèlement nous avons passé en gel filtration des quantités importantes de sérum sanguin (3 l) pour déterminer s'il était possible de mettre en évidence une zone d'élution après l'albumine. Nous n'avons jamais pu trouver une telle fraction.

La fraction pré-albumine albumine comprend :

- la pré-albumine qui a donc un poids moléculaire proche de celui de l'albumine.

- la deuxième sidérophiline : lorsqu'on repasse cette fraction une deuxième fois sur Séphadex il semble qu'elle s'élue légèrement après la première.

La dernière fraction d'élution post-albuminique est intéressante puisqu'elle montre outre des traces de sidérophiline, d'albumine et d'orosomucoïde (pré-albumine lente en gel d'amidon), de nombreuses fractions qui ne sont pas révélées par un immunosérum antisérum humain et normal :

les 2 post- γ : lente et intermédiaire

un composant important dans la zone β_c

un composant post-albuminique.

Nous avons été tout de suite frappé par la similitude de cette composition avec celle que nous trouvions dans la même zone d'élution en gel filtration de certaines protéinuries consécutives à des tubulopathies (planche 16). Malheureusement nous ne disposions pas à ce moment d'immunosérums spécifiques qui nous auraient permis d'identifier les uns par rapport aux autres ces divers composants. Nous sommes en train d'immuniser des animaux avec ces fractions et nous verrons plus loin qu'avec un immunosérum révélant les "post- γ " globulines il est possible d'établir la caractérisation immunologique de cet éluat post-albuminique et donc d'établir l'identité de ces fractions "post- γ " globuliniques urinaires avec leurs homologues dans le LCR.

Si on reprend les éluats V et VI sur Séphadex G 200 on obtient alors une fraction qui ne contient plus en électrophorèse en gel d'amidon que des "post-albumines", un composant β_c et les 2 "post- γ " à l'exclusion de toute protéine sérique.

Ainsi donc après gel filtration sur Séphadex nous nous trouvons devant :

- une fraction qui après 3 ou 4 passages ne comprenait plus que la pré-albumine, l'albumine et les 2 sidérophilines et

- une deuxième fraction ne contenant plus qu'une post-albumine, un composant β_c dépourvu de sidérophiline et 2 "post- γ " globulines. Il nous a semblé alors intéressant de continuer cette purification par une électrophorèse prépara-

tive.

Electrophorèse préparative :

Nous avons utilisé pour ceci les techniques décrites plus haut avec pour support une substance inerte le PEVIKON en tampon véronal. Ce tampon a l'avantage de ne laisser en position pré-albuminique que la pré-albumine riche en tryptophanne. Nous n'étions donc pas gênés par l'orosomucoïde. De plus ce tampon sépare bien les 2 fractions sidérophilines. Cette méthode a donc été à la base de la préparation de la pré-albumine et de la deuxième sidérophiline.

Mais dès le début nous avons eu quelques difficultés : si la pré-albumine du LCR s'est révélée très stable, les sidérophilines par contre l'étaient beaucoup moins ce qui nous a obligé à quelques modifications.

PLANCHE N° 9

GEL - FILTRATION de LCR de cadavre en SEPHADEX G 200.

Fig 1 :

Electrophorèse en gel d'amidon des différentes fractions éluées après gel filtration.

Fig 2 :

Electrophorèse en gélose des mêmes fractions.

Fig 3 :

Etude par électrophorèse en gel d'amidon des fractions 4 et 5 après une deuxième gel filtration et une électrophorèse préparative sur Pévikon (en gardant la zone β et γ).

A gauche : Une pré-albumine de LCR purifiée, à droite : un LCR de cadavre.

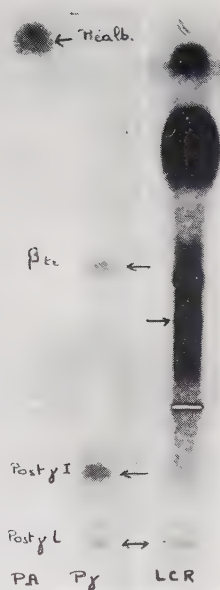
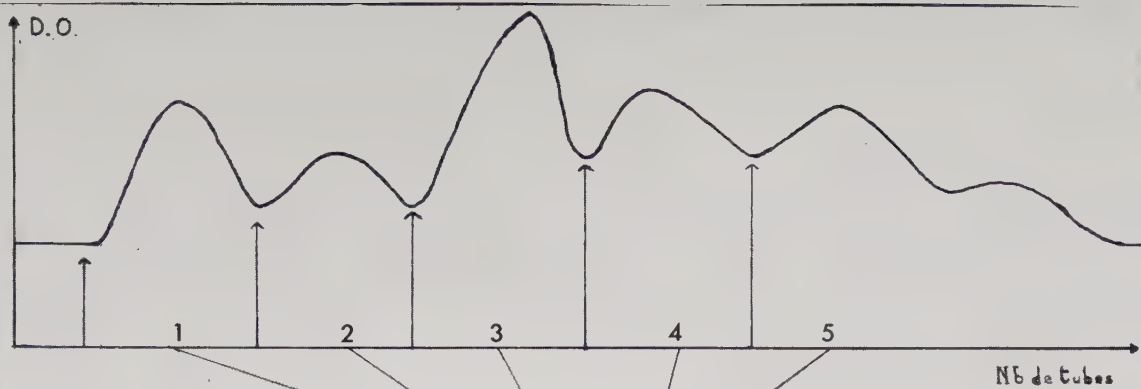
Fig 4

Analyse immunologique (immunsérum standard) à partir d'une électrophorèse en gel d'amidon de la fraction 3 (en bas : un sérum normal).

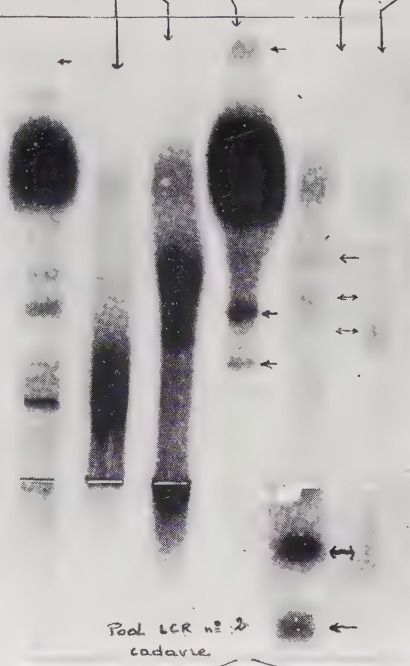
On note le raccordement des lignes de précipitation correspondant à la sidérophiline et à la ligne "inter α - β ".

Fig 5

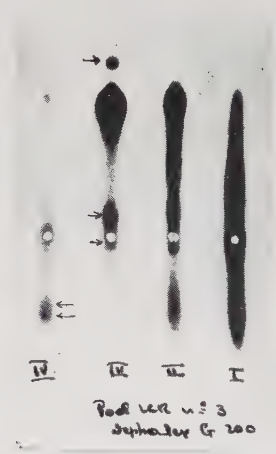
Séparation par électrophorèse préparative en Pévikon des différentes protéines contenues dans la fraction 3. Pré-albumine, albumine et α 1 globulines, sidérophiline 1 (sérique) et sidérophiline 2 (LCR).



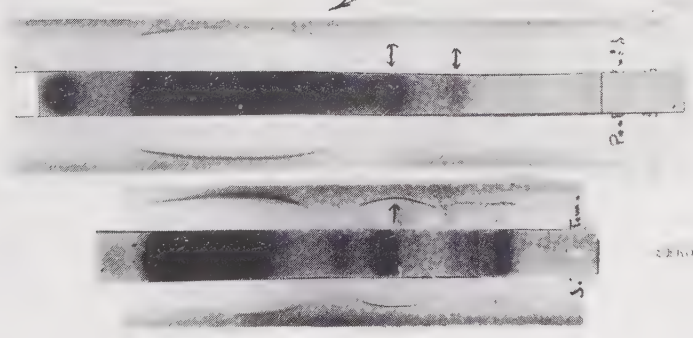
3



1



2



4



5

1 : Isolement de la pré-albumine :

A partir de la fraction isolée sur Séphadex, fraction correspondant à l'albumine et qui ne comprend plus que la pré-albumine, l'orosomucoïde, l'albumine et les 2 sidérophilines accompagnés de quelques traces de protéines de poids moléculaires voisins, nous avons pu par électrophorèse préparative avec tampon véronal isoler très facilement la pré-albumine. En une seule électrophorèse préparative, bien réussie, il est possible d'obtenir de la pré-albumine parfaitement pure. Le seul inconvénient de cette méthode est d'obtenir une pré-albumine en solution dans un tampon véronal : or un temps ultérieur de nos études sur cette protéine est le dosage du tryptophane par une méthode spectrophotométrique en UV. Il nous a fallu effectuer des dialyses extrêmement longues pour nous débarrasser du véronal qui comme on le sait absorbe dans la même zone en UV. Sur nos divers échantillons des dialyses successives ont été faites contre sérum physiologique :

- en cours de concentration
- en fin de concentration pour ramener la solution au volume désiré
- et après obtention d'un volume de dialysat convenable nous avons fait des dialyses prolongées de 24 heures chacune, 3 à 4 fois. Nous avons ensuite vérifié la pureté de nos préparations par les diverses techniques que nous avons décrites.

2 : Préparation des sidérophilines :

Nous nous sommes attachés à préparer par les mêmes méthodes la sidérophiline qui correspond à celle du sérum et la sidérophiline qui paraît spécifique du LCR. Nous n'avons utilisé la même fraction d'élution après Séphadex que celle qui contenait déjà l'albumine et la pré-albumine.

En fait la séparation des 2 sidérophilines s'est révélée pleine d'aléas car nous obtenions régulièrement des protéines qui se dénaturaient très vite et nous avons perdu ainsi énormément de produit sans jamais arriver à trouver un mode de préparation qui ne dénature pas. Nous avons donc essayé divers tampons puisque dans nos méthodes seuls les tampons pouvaient être mis en cause.

Après l'essai de divers tampons nous avons pu obtenir des sidérophilines stables par l'utilisation pour la gel filtration non plus d'un tampon Tris 0,2 M mais un tampon moins riche en Tris (Tris 0,1 M - ClNa 0,2 M). La séparation obtenue est aussi bonne et nous évitons ainsi toute dénaturation après gel filtration. Ce point ayant été résolu, nous obtenions encore des dénaturations après le second temps de la purification qui était le passage par électrophorèse préparative en tampon véronal. Nous avons acquis la certitude que c'était le tampon véronal lui-même qui dénaturait les sidérophilines ou tout du moins les fragilisait considérablement : en effet après 2 ou 3 purifications successives elles étaient soit dénaturées soit incapables de supporter une conservation à + 4° C.

De plus même après un premier passage nous nous sommes aperçus que

ces transferrines se conservaient très mal à + 4° C. Nous avons étudié cette dénaturation et nous montrons (planche 14) que les modifications subies par la sidérophiline normale ont un aspect très particulier qui rappelle celui que l'on trouve après traitement par la neuraminidase comme nous le verrons plus loin.

Nous avons alors essayé de travailler non pas en tampon véronal mais en tampon borate. Après divers essais c'est un tampon borate 0,2 M qui nous a donné les meilleurs résultats. Dans ces conditions il était possible de préparer des sidérophilines stables résistant à une conservation prolongée à + 4° C. C'est ce que montrent les témoins en gel d'amidon que nous proposons. Malheureusement nous n'avons pu utiliser cette méthode que tardivement si bien que nous avons perdu de grosses quantités de produit. Toutefois la méthode paraît maintenant sûre. On peut donc pour les sidérophilines conseiller après une gel filtration sur Séphadex G 200 une séparation par électrophorèse préparative sur support Pévikon en tampon borate 0,2 M.

Malheureusement ce deuxième temps possède un inconvénient important : il oblige à faire une deuxième électrophorèse préparative pour la pré-albumine, car cette protéine ne peut être séparée pure qu'en tampon véronal puisqu'en tampon borate elle migre avec l'orosomucoïde $\alpha 1$ comme en gel d'amidon.

Nous étions donc obligé de faire 2 électrophorèses préparatives en tampons différents pour la pré-albumine ou de sacrifier un échantillon sur deux pour préparer soit la pré-albumine soit les sidérophilines ce qui a encore ajouté aux difficultés que nous avons rencontrées pour préparer des quantités suffisantes de protéines.

Signalons enfin le danger de la lyophilisation qui peut elle seule dénaturer la sidérophiline.

Nous étudierons dans le chapitre que nous lui réservons la nature de cette dénaturation.

3 : Préparation des protéines témoins :

Il nous restait en plus à préparer des protéines d'origine sérique pour les comparer aux protéines isolées du LCR. Il fallait également des témoins sériques pour étudier l'action de la neuraminidase sur les transferrines comme nous le verrons plus loin. De plus il fallait mettre au point une méthode de séparation qui puisse nous donner de grosses quantités de protéines sériques. Nous avons pour cela usé d'un artifice pour obtenir des sidérophilines sériques humaines en quantité importante : nous nous sommes adressés aux urines que l'on trouve dans les syndromes néphrotiques de l'enfant lors de protéinuries de type très sélectif (REVILLARD et MANUEL) (35). Le filtre glomérulaire s'avère en effet un filtre idéal et bien supérieur à la gel filtration en Séphadex. Cette sélectivité est telle que dans la zone de la sidérophiline nous ne trouvons dans certaines protéinuries aucuns éléments parasites tels qu'hémopexine, γA , $\beta 1 A$, etc... si bien que par simple électrophorèse préparative il nous était possible de séparer de grosses quantités d'une sidérophiline pratiquement pure, n'ayant que quelques traces d'albumine. C'est à partir de ces échantillons que nous avons pu étudier la dénaturation de la transferrine à partir du tampon véronal.

Nous avons du par ailleurs préparer des sidérophilines d'origine animale pour étudier l'action enzymatique de la neuraminidase. Nous avons ainsi préparé des sidérophilines de babouins, de chien et de carpe par la même méthode combinée déjà décrite. Malheureusement nous n'avions pas à notre disposition d'urines pathologiques et nous avons dû les préparer à partir de sérums complets. Il ne nous a donc pas été possible d'obtenir par nos méthodes des fractions parfaitement pures car les protéines qui les contaminent ont des poids moléculaires très voisins. Néanmoins les préparations étaient suffisantes pour permettre une appréciation des modifications dues à l'action de la neuraminidase.

4 : Les "post- γ " globulines et autres protéines particulières :

La préparation de ces protéines a été relativement facile si on les considère en totalité. En effet leur poids moléculaire fait qu'il est relativement facile de les séparer de la fraction albumine en gel filtration sur Séphadex G 200. Par contre les séparer les unes des autres s'est révélé beaucoup plus difficile notamment en ce qui concerne les "post- γ " globulines. Deux difficultés sont apparues :

- leur faible quantité relative
- leur changement de mobilité lors de leur vieillissement.

Nous avons vu que les "post- γ " changent de mobilité sur papier et en gélose en vieillissant et ceci très rapidement. Elles peuvent ainsi acquérir une mobilité de β 2. Or dans cette zone il existe un deuxième composant de petit poids moléculaire que LATERRE a d'abord appelé " β trace", composant qui est également spécifique du LCR et qui tend à recouvrir la zone de migration de ce que nous avons appelé la "post- γ " intermédiaire. Nous avons pensé à un artifice qui permettrait de séparer ces 2 fractions. Or nous avons remarqué qu'en électrophorèse en gel d'amidon les "post- γ ", même ayant atteint leur mobilité maximum, restaient toujours dans la zone γ du gel (cathodique par rapport à la fente d'inclusion). Ceci était précieux puisque les autres fractions protéiques comme nous l'avons décrit dans notre chapitre précédent se trouvaient dans les zones " β c" et "post-albumine", soit dans la partie anodique du gel d'amidon par rapport à la fente d'inclusion. Il était donc facile à partir de l'électrophorèse en gel d'amidon de purifier les "post- γ " exclusivement. Malheureusement nous avons vu les difficultés qu'il y avait à éluer les fractions obtenues du gel d'amidon. Les pertes sont très importantes, ce qui explique la petite quantité de produit que nous avons pu préparer. Toutefois dans les derniers temps de ce travail nous avons pu faire la preuve de l'identité qu'il y avait entre les "post- γ " du LCR et celles de certaines protéinuries, notamment d'origine tubulaire. Or, nous avons mené parallèlement une étude sur les protéinuries (REVILLARD et MANUEL) (36) et nous avons conservé de nombreux échantillons d'urines contenant ces "post- γ " globulines. Nous avons là une source inépuisable de protéines et nous préparons actuellement des "post- γ " d'origine urinaire. Il semble qu'actuellement nous soyons les seuls à avoir

réussi la purification de ces protéines.

Déjà les problèmes mêmes de la séparation des protéines du LCR montrent à quel point il est intéressant d'avoir pu comparer la composition protéique de ce liquide avec celle d'autres liquides biologiques humains. Rien que ce fait justifierait le prochain chapitre mais il est d'autres éléments tout aussi intéressants qui le rendent indispensable.

ETUDE DE QUELQUES PROTEINES ISOLEES A PARTIR DU LIQUIDE CEPHALORACHIDIEN

Par les techniques que nous venons de décrire nous avons pu isoler et purifier la pré-albumine et les "post- γ ". Nous avons pu par ailleurs isoler partiellement les deux sidérophilines que contient le liquide céphalorachidien.

I LA PRE-ALBUMINE

La pré-albumine a été la première protéine du liquide céphalorachidien étudiée. En effet, les premiers auteurs qui ont étudié les protéinogrammes du liquide céphalorachidien, ont été très rapidement frappés par la présence de ce composant inhabituel migrant en position pré-albuminique. C'est ALY qui, dès 1954, a isolé cette pré-albumine du liquide céphalorachidien qu'il a appelée : "Vor-fraktion"; il venait après de nombreux auteurs qui l'avaient caractérisée dans le liquide céphalorachidien (KABAT 1942, FISK et collaborateurs 1951). Après l'avoir isolée, ALY lui a trouvé un coefficient de sédimentation de 4,2, une teneur en hexosamine de 0,4 à 1,4 % et d'azote de 16 %. ALY avait déjà remarqué que cette pré-albumine avait une teneur en tryptophane beaucoup plus élevée que l'albumine elle-même (37).

Par ailleurs dans le sérum, HOCH et CHANUTIN dès 1953 décrivaient une pré-albumine. Ce sont les travaux de SCHULTZE et Collaborateurs (38) dès 1956 qui permirent d'isoler du sérum une fraction pré-albuminique qu'ils appelèrent pré-albumine riche en tryptophane à cause de sa richesse en tryptophane. Ils en ont déterminé les principales caractéristiques et retrouvent comme ALY une constante de sédimentation de 4,2 et une teneur en glucides faible, 1,2 % d'héxoses, 0,15 % d'hexosamines et surtout ils remarquent une particularité : l'absence d'acide sialique dans cette glycoprotéine (39).

En 1957 ALY démontre l'identité physico-chimique de la pré-albumine du liquide céphalorachidien et de la pré-albumine sérique et dès 1960 FRICK démontre leur identité immunologique (40).

Toutefois, en 1963 GOT et Collaborateurs ont indiqué des teneurs en glucides nettement plus élevées que ne les avait trouvées SCHULTZE. GOT et Collaborateurs donnent 14,2 % d'azote, 96 % de peptides par le Biuret, 0,9 % d'osamines après hydrolyse de 4 heures à 100° C par HCL 3 N, 2,3 % d'hexoses et 2,3 % d'acide sialique.

La mobilité qu'ils déterminent est de $7,6 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \times \text{volts}^{-1} \times \text{sec.}^{-1}$ à pH 8,6. SCHULTZE et Collaborateurs avaient déterminé une mobilité électrophorétique égale à 9 soit 50 % supérieure à celle de l'albumine. Mais ils admettent que la valeur de cette mobilité augmente en fonction de la purification, les préparations les moins purifiées ayant une mobilité de 20 % seulement supérieure à celle de l'albumine.

GOT et BOURILLON montrent que, par électrophorèse sur papier, la mobilité de la pré-albumine est indépendante de sa pureté. La pré-albumine a la même mobilité que celle obtenue lors de l'électrophorèse de la protéine pure même si on s'est contenté d'enrichir le sérum avec une préparation pure. GOT et Collaborateurs retrouvent la même constante de sédimentation de 4,15, mais à la différence de SCHULTZE et Collaborateurs ils trouvent que cette constante de sédimentation varie avec la concentration protéique de la solution que l'on étudie. SCHULTZE avait noté en effet, une droite d'extrapolation de pente nulle alors que GOT et BOURILLON trouvent une droite d'extrapolation de pente légèrement négative (41).

Très récemment OPPENHEIMER et Collaborateurs (42) ont décrit en 1965 une pré-albumine fixant la thyroxine. Ils l'ont isolée dans le sérum, l'ont étudiée et ont trouvé des caractéristiques sensiblement différentes de celles des auteurs précédents. Ils trouvent comme les auteurs précédents une très haute teneur en tryptophane, 3 %, et en Tyrosine, 6,6 %, mais à la différence de SCHULTZE et Collaborateurs et de GOT et Collaborateurs, ils trouvent une constante de sédimentation beaucoup plus élevée à 4,58, chiffre extrapolé à 0 mais non corrigé.

Ils concluent ainsi à un poids moléculaire approximatif de 73 000, ils remarquent la différence qu'ils trouvent avec les résultats de SCHULTZE et de GOT et pensent que les techniques d'isolement de ces auteurs ont pu amener le détachement de quelques fragments de pré-albumine, expliquant ces différences. Ils notent en plus un taux de tryptophane plus élevé puisqu'il est de 3,15 % contre 2,5 % pour les autres auteurs.

Recherches personnelles

1) Critères de pureté

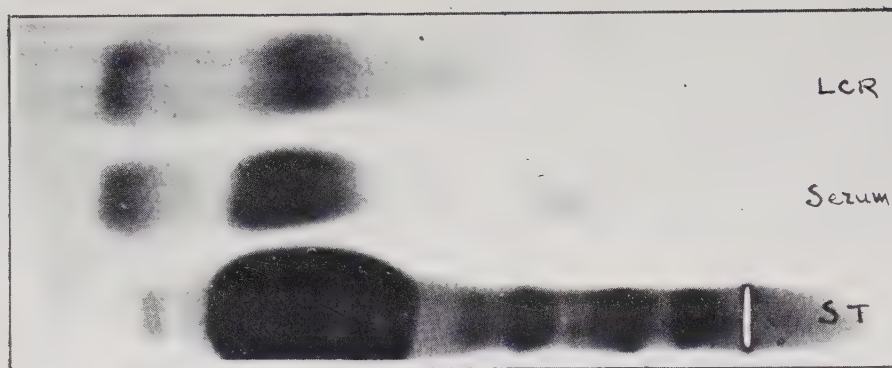
Nous avons vérifié la pureté de nos préparations par immunoélectrophorèse, par électrophorèse en gel d'amidon, par ultra-centrifugation, (Schlieren-method). Nous résumons dans la planche 10 ces différents critères.

2) Résultats

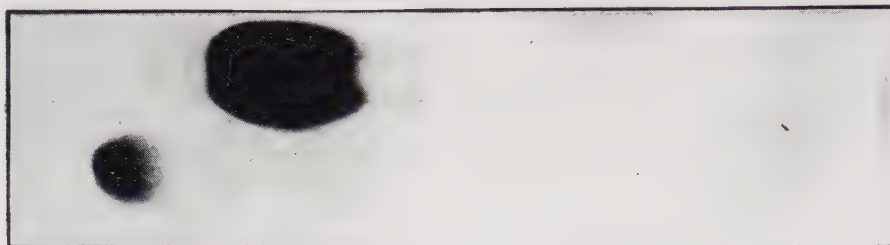
a) Mobilité en veine liquide

Nous trouvons une mobilité de 9 à pH 8,6 ce qui correspond à une mobilité supérieure de 50 % à celle de l'albumine, ceci en accord avec les résultats de SCHULTZE.

PLANCHE 10



1



2

Temps compté, à partir du moment d'obtention de la vitesse de régime, en minutes :

TEMPS:

~~XXXX~~

22'

38'

54'

70'

BARRE:

60

60

60

60



Cliché photographique N° 2.524

Référence N°

3

b) Mobilités relatives dans les différentes techniques électrophorétiques.

La mobilité apparente sur papier, comme en gel d'amidon, semble extrêmement dépendante de la pureté de la protéine. Sur papier en effet, nous avons été frappés par la différence de mobilité de la pré-albumine dans le liquide céphalorachidien avec la pré-albumine dans le sérum lorsqu'elle était visible. Nous avons retrouvé ce fait en gel d'amidon. Nous avons alors enrichi de pré-albumine sérique un sérum et nous avons fait une migration parallèle avec un mélange pré-albumine pure/albumine de liquide céphalorachidien. Les résultats sont visibles sur la planche 10 et montrent que, à rapport pré-albumine/albumine égal, les mobilités sont strictement comparables en gel d'amidon.

c) L'ultra-centrifugation

Nous avons étudié la constante de sédimentation de la pré-albumine par absorption dans l'ultra-violet. Ceci nous a permis de travailler directement à des concentrations très basses.

Nous avons trouvé régulièrement une constante de sédimentation de l'ordre de 4,55 sans corrections. La courbe d'extrapolation montre qu'elle a une pente faible mais indiscutable et négative, ceci en accord avec les résultats de GOT et BOURILLON. Notre constante de sédimentation après extrapolation, est la même que celle décrite par OPPENHEIMER et beaucoup plus importante que celle décrite par ALY, SCHULTZE et GOT; ceci également, est en accord avec le fait qu'il est pratiquement impossible en Séphadex G 200 de dissocier l'albumine de la pré-albumine.

PLANCHE N° 10

Fig 1 :

En haut : pré-albumine de LCR avec de l'albumine.

Au milieu : pré-albumine sérique avec de l'albumine : le rapport pré-albumine/albumine est identique au précédent.

En bas : Sérum témoin.

On note l'identité des mobilités des pré-albumines lorsque le rapport pré-albumine/albumine est identique.

Fig 2 :

En haut : albumine après Pévikon sur LCR

En bas : par comparaison pré-albumine purifiée

Fig 3 :

Ultracentrifugation (SCHLIEREN) de la pré-albumine purifiée : on note la symétrie du pic obtenu.

d) Composition en Acides Aminés

Nous avons fait cette étude après 2 hydrolyses, une à 24 heures et l'autre à 48 heures.

- Le premier hydrolysât (n° 48) 1,5 ml de solution de pré-albumine a été mélangé à 1,5 ml d' HCL Merck additionné de 0,06 % (P/V) de trichlorure de titane pour éviter la formation de charbon ; la durée d'hydrolyse a été de 24 heures en tube scellé sous vide.

- Le deuxième hydrolysât (n° 49) a été de 48 heures et les quantités en présence de 1,4 ml de solution de pré-albumine additionnée de 1,4 ml d'acide chlorhydrique. Les corrections ont été faites de la façon suivante : pour la sérine, la thréonine, la tyrosine on a appliqué la formule de correction :

$$A_0 = \frac{t_2}{t_2 - t_1} A_1 - \frac{t_1}{t_2 - t_1} A_2$$

Pour la valine on conserve le chiffre à 48 heures, pour les autres acides aminés on fait la moyenne des chiffres obtenus après hydrolyse de 24 et 48 heures.

L'acide aspartique présente une irrégularité : en effet le taux d'acide aspartique après 48 heures est supérieur à celui trouvé après 24 heures ce qui est anormal. Nous avons gardé le chiffre de 48 heures. Par ailleurs le phénomène inverse s'est produit pour l'ammoniaque, nous avons également gardé le chiffre de 48 heures.

PLANCHE N° 11

PRE-ALBUMINE

Fig 1 :

Compte-rendu d'un essai : technique par absorption dans l'ultraviolet :

Vitesse : 59.780 rpm

: Temp. : 20,96° C.

Fig 2 :

Microdensitométrie de l'essai précédent.

Fig 3 :

Extrapolation à concentration 0 des 3 essais réalisés.

Substance : PREALBUMINE.
 Solvant : Sérum physiologique
 pH : 7
 D.O. = 1,00

Vitesse de régime en t/min. : 59.780
 Durée de démarrage, en min. et sec. : 17'
 Température moyenne d'expérience : 20,96°C
 Cellule { nature : standard
 épaisseur en mm : 12 mm = 4
 angle du secteur en degré :

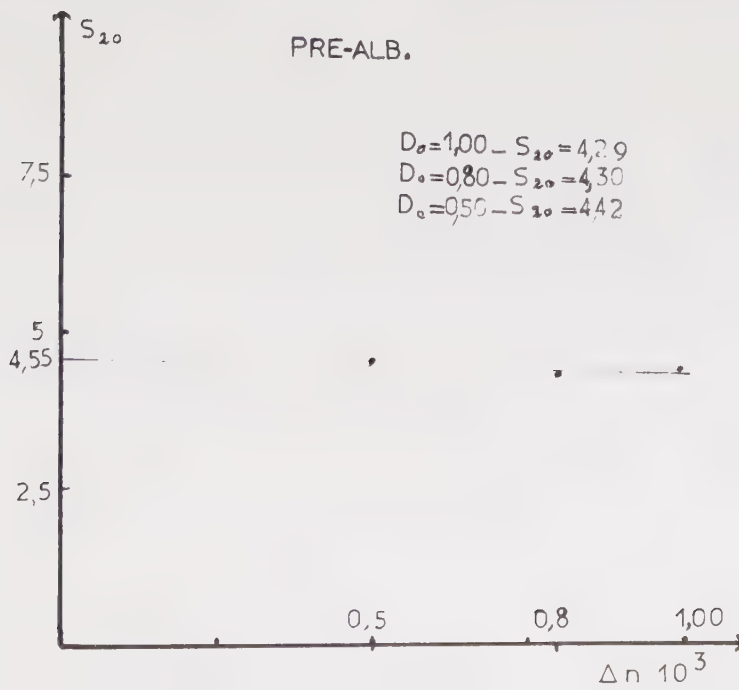
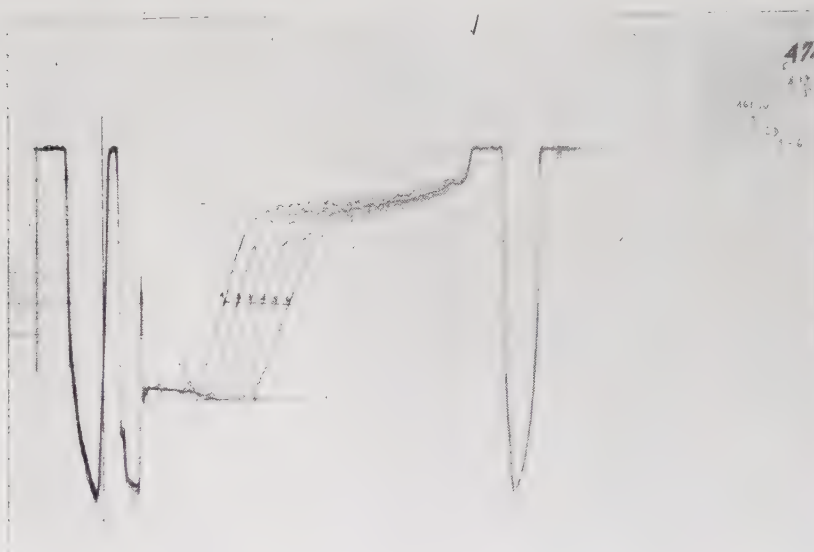
A : temps compté à partir de l'établissement de la vitesse de régime (heures et min.)

B : temps de pose (sec.)

N°	A	B	B	A	N°
1	8'	32"	32"	72'	9
2	16'	"	"	80'	10
3	24'	"	"	88'	11
4	32'	"	"	96'	12
5	40'	"			13
6	48'	"			14
7	56'	"			15
8	64'	"			16

INTERPRÉTATIONS :

Un constituant apparent. Le coefficient de sédimentation à 20°C est de 4,29 pour une concentration totale correspondant à une densité optique de 1,00



Enfin, tous nos résultats sont exprimés pour 100 acides aminés. Le tableau que nous présentons donne les acides aminés dans leur ordre d'élution en chromatographie (1er tableau).

Le tryptophanne : son cas était un peu particulier puisque nous utilisons une méthode spectrophotométrique pour sa détermination. Nous déterminons le rapport molaire $\frac{\text{tyrosine}}{\text{tryptophanne}}$; la moyenne des différentes mesures que nous avons faites, nous a donné un rapport molaire $\frac{\text{tyrosine}}{\text{tryptophanne}}$ égal à 1,5.

Si nous considérons le chiffre de tyrosine après correction, nous retenons qu'il est de 4,84, cela nous donne une teneur en % d'acides aminés de l'ordre de 3,20.

Résidus pour 100 Acides Aminés

Pré-albumine	24 H	48 H	après correction	Pré-albumine sérique d'après SCHULTZE
OH lysine				
Lysine	7,79	7,57	7,68	6,96
Histidine	3,85	3,85	3,86	3,62
NH ₃	3,43	2,10	2,10	1,00
Arginine	4,66	4,73	4,70	4,27
Acide Cystéique	0,52	0,35	0,44	
Méthionine sulfoxyde	traces	traces		
OH Proline				
Acide Aspartique	7,90	8,70	8,70	6,44
Méthionine sulfone				
Thréonine	8,34	8,09	8,59	9,17
Sérine	7,31	6,86	7,76	7,36
Acide Glutamique	13,26	13,21	8,23	10,91
Proline	5,85	5,59	5,72	5,31
Glycine	4,11	4,02	4,70	3,94
Alanine	6,15	6,22	6,18	6,25
Valine	6,28	7,42	7,42	8,44
Cystéine	0			0
Méthionine	traces	traces		0,86
Isoleucine	3,75	3,99	3,87	3,68
Leucine	6,50	6,65	6,58	5,50
Tyrosine	5,02	5,20	4,84	5,51
Phénylalanine	5,25	5,41	5,33	5,11
Total	99,98	99,96		
Tryptophanne			3,2	2,40

Composition en Acides Aminés de notre préparation de Pré-albumine. Les chiffres sont indiqués en comparaison avec ceux donnés par SCHULTZE pour la Pré-albumine sérique.

Discussion de ces résultats

L'analyse des pourcentages d'acides aminés les uns par rapport aux autres, par rapport à ceux donnés par SCHULTZE et Coll., montre quelques petites différences sensibles.

Ces différences portent essentiellement sur le taux d'acide aspartique, thréonine, acide glutamique, valine. Les autres chiffres sont à peu près identiques.

Notre taux d'acide aspartique maximum est nettement inférieur à celui que donne SCHULTZE, toutefois l'anomalie que nous avons eue en hydrolyse ne nous permet pas d'être affirmatif. Par contre, nous trouvons une teneur nettement moins élevée de thréonine et nettement plus élevée par contre d'acide glutamique. Enfin, nous trouvons une valeur beaucoup moins élevée de valine.

Nos résultats quant au tryptophane se rapprochent des résultats donnés par OPPENHEIMER et nos chiffres sont nettement plus élevés que ceux de SCHULTZE, toutefois notre méthode de détermination est différente, puisque SCHULTZE a utilisé une méthode chimique, alors que nous avons utilisé une méthode spectrophotométrique.

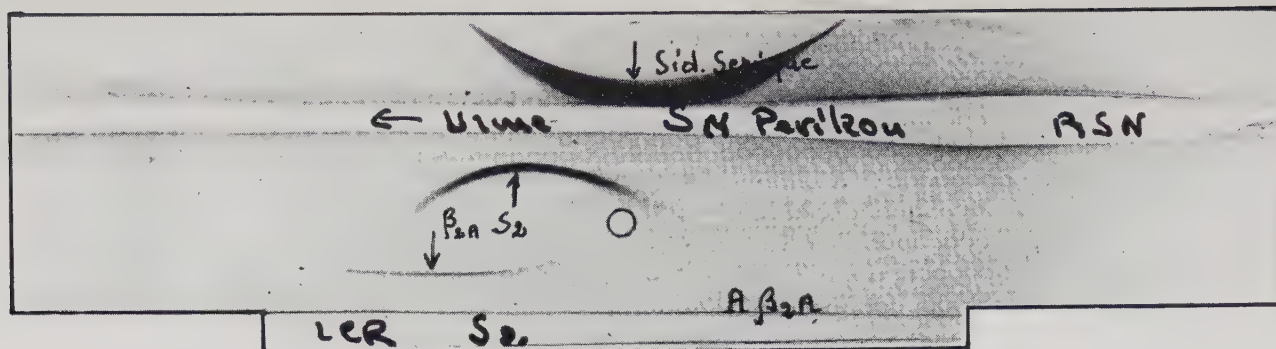
II Les sidérophilines :

Le problème de la sidérophiline dans le LCR est actuellement dominé par les travaux de PARKER et BEARN (44). En effet jusqu'à ces auteurs on avait identifié une deuxième sidérophiline dans le LCR différente de la sidérophiline correspondante à celle du sérum, ce sont les travaux de BURTIN (1959), PETTE et STUPPE (1960), puis CLAUSEN (1960-1961) (45). PETTE et STUPPE ont les premiers montré que la sidérophiline du LCR traitée par de la neuraminidase se transformait en totalité en un composant ayant la mobilité du composant "tau" c'est-à-dire la mobilité de la deuxième sidérophiline spécifique du LCR. Les travaux de PARKER ont étudié en détail l'action de la neuraminidase sur la sidérophiline. Nous indiquons l'essentiel de leurs résultats.

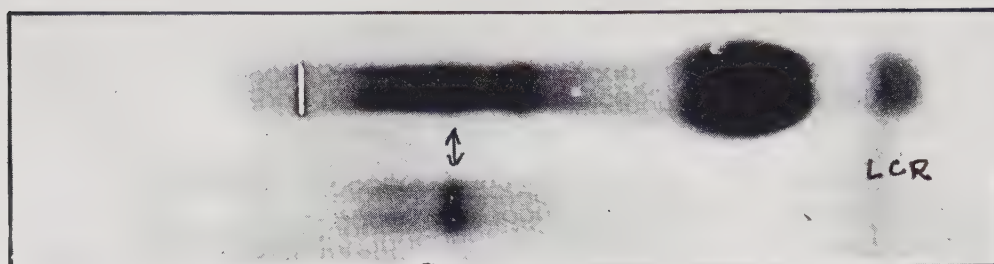
Action de la neuraminidase sur la sidérophiline sérique :

D'une façon générale la neuraminidase agit sur une glycoprotéine en enlevant les molécules d'acide sialique qu'elle contient. Or, de récentes études sur la structure des glycoprotéines ont montré que l'acide sialique était toujours situé en bout de chaîne, si bien qu'il peut être détaché sans que le reste de la molécule subisse un quelconque changement à l'exception de son comportement dans un champ électrique. En règle générale les glycoprotéines humaines ont une migration électrophorétique retardée à pH 8,6.

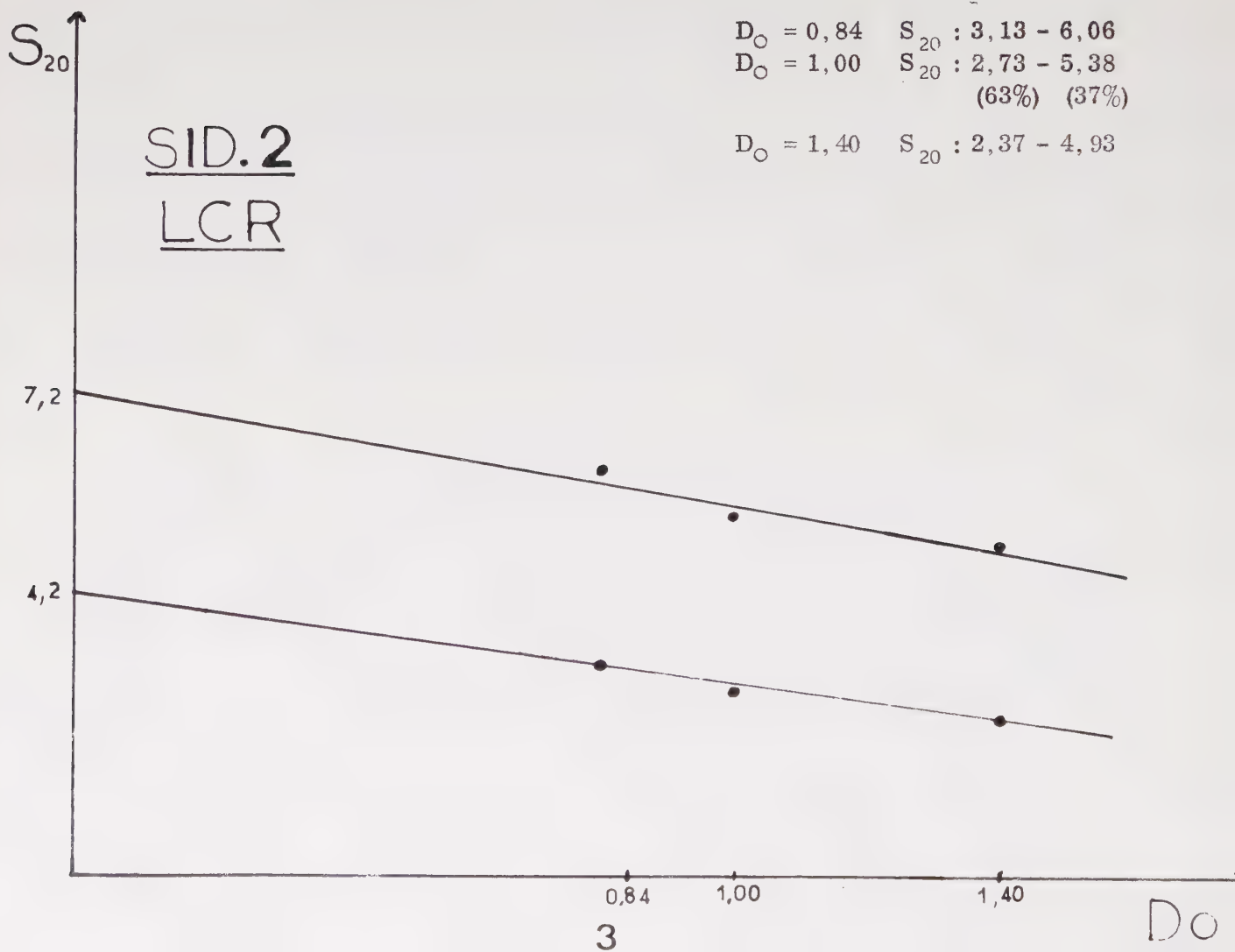
PARKER a étudié l'action de la neuraminidase en proportion croissante et il a noté que la sidérophiline passait par cinq stades successifs en électrophorèse



1



2



en gel d'amidon avant d'aboutir à la position qui correspond à celle de la deuxième sidérophiline du LCR. PARKER et BEARN en 1962 (46) ont émis l'hypothèse que chaque stade successif correspondait à l'enlèvement d'un acide sialique de la molécule, or la sidérophiline humaine contient quatre résidus d'acide sialique par molécule ce qui fait cinq positions possibles si l'on compte une bande correspondant à une sidérophiline dont l'acide sialique aurait été complètement enlevé.

Ces travaux ont été récemment repris par LATERRE qui confirme entièrement les données expérimentales de PARKER (47).

Recherches personnelles :

Nous avons essayé d'isoler les deux sidérophilines du LCR dans le but de vérifier leur identité (à l'acide sialique près).

PLANCHE N° 12

SIDEROPHILINE

Fig 1 :

Immuno-électrophorèse de sidérophiline propre au LCR (S_2) en comparaison avec de la sidérophiline sérique. La révélation avec un immunsérum de lapin anti γ A montre la présence d'impuretés γ A.

Fig 2 :

Electrophorèse en gel d'amidon de sidérophiline propre au LCR en comparaison avec un LCR de cadavre. On retrouve les mêmes impuretés.

Fig 3 :

Extrapolation à concentration 0 des 3 essais à concentrations décroissantes de la précédente préparation de sidérophiline propre au LCR (Ultra - centrifugation ; technique par absorption dans l'ultraviolet).

Il faut en effet vérifier l'absence d'acide sialique dans la deuxième sidérophiline du LCR et vérifier qu'elle ne subit pas de changement quant à sa masse moléculaire (à 4 acides sialiques près).

a) Après avoir isolé les deux sidérophilines séparément par les techniques que nous avons déjà envisagées nous avons essayé de déterminer pour chacune de ces sidérophilines une constante de sédimentation extrapolée à la concentration 0.

- 1ère sidérophiline (S_1) : nous avons trouvé un S_{20}^0 égal à 5,10 (technique par absorption dans l'ultraviolet), ce qui correspond à la constante de sédimentation de la sidérophiline sérique.

- 2ème sidérophiline (S_2) : lorsque nous avons fait nos différents essais d'ultracentrifugation nous n'avons pas encore réussi à purifier complètement cette deuxième sidérophiline. Il restait toujours une petite quantité de γ globulines.

PLANCHE N° 13

SIDÉROPHILINE

Fig 1 :

Fig 1 :

Ultracentrifugation de la sidérophiline propre au LCR (échantillon décrit dans la planche n° 12).

Fig 2 :

Fig 2 : Microdensitométrie du même essai : on note facilement l'hétérogénéité de la courbe qui montre 2 constituants.

Fig 3 :

C.N.R.S.
STATION CENTRALE D'ULTRACENTRIFUGATION
13, rue Pierre-Curie
PARIS (5^e)

Date : 19 FEVRIER 1965

Demandeur : Monsieur le Docteur Y. MANUEL

Adresse : Service de Monsieur le Professeur PAUFIQUE

Clinique Ophtalmologique - Pavillon C

HÔPITAL Edouard HERRIOT - LYON (Rhône)

2^{ème} ESSAI.

COMPTE RENDU D'ESSAI : TECHNIQUE PAR ABSORPTION DANS L'ULTRAVIOLET

Substance : SIDEROPHILINE S_2 L.C.R sans acide sialique

Solvant : Sérum physiologique

pH : 7

D.O. = 1,00

Vitesse de régime en $\frac{1}{\text{min}}$: 59.780

Durée de démarrage, en min. et sec. : 13'

Température moyenne d'expérience : 20°C

Cellule $\left\{ \begin{array}{l} \text{nature : standard} \\ \text{épaisseur en mm : 12 mm } \alpha = 4 \\ \text{angle du secteur en degré : } \end{array} \right.$

A : temps compté à partir de l'établissement de la vitesse de régime (heures et min.)

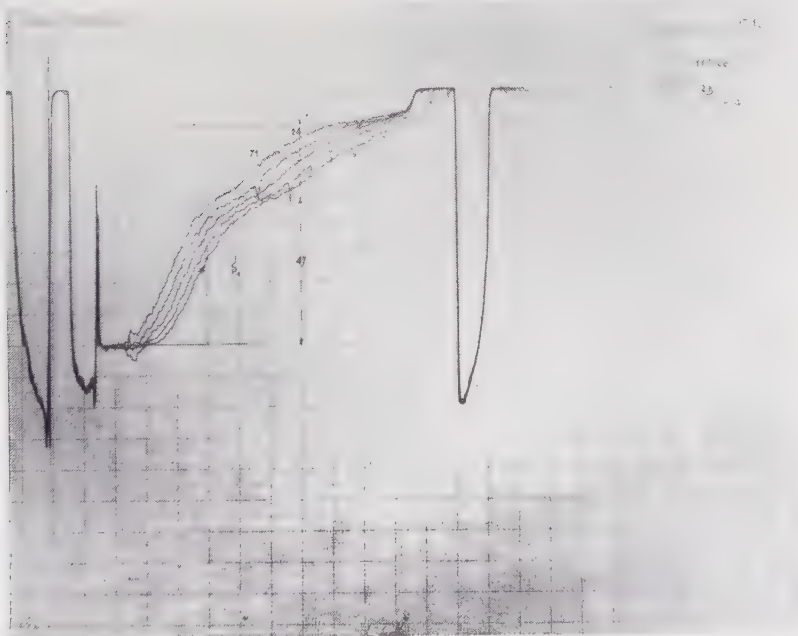
B : temps de pose (sec.)

N°	A	B	B	A	N°
1	2'	35''	35''	66'	9
2	10'	''	''	74'	10
3	18'	''	''	82'	11
4	26'	''	''	90'	12
5	34'	''	''	98'	13
6	42'	''	''	106'	14
7	50'	''	''	114'	15
8	58'	''	''		16

INTERPRÉTATIONS :

Deux constituants apparents. Les coefficients de sédimentation à 20°C et les concentrations respectives sont $S_1 = 2,73$ (63%) - $S_2 = 5,38$ (37%) pour une concentration correspondant à une densité optique de 1,00.

1



2

Les résultats que nous donnons correspondent en fait à une ultracentrifugation qui a porté sur un mélange de deux constituants. Les chiffres obtenus seront contestables car il est impossible par la technique en ultraviolet d'apprécier une hétérogénéité dans un constituant et à fortiori pour deux constituants principaux. Ces chiffres ne sont donc donnés qu'à titre indicatif :

- 1er constituant : 63 % S_{20}^0 compris entre 3,8 et 4,2
- 2ème constituant : 37 % S_{20}^0 compris entre 5,5 et 7

Ce deuxième composant semble correspondre au contaminant γ de nos préparations. Il faudrait donc admettre une constante de sédimentation de l'ordre de 4 pour la deuxième sidérophiline. Or, ce fait ne peut s'expliquer par une action de type neurominidase sur une sidérophiline de type sérique. Un tel résultat demande à être vérifié sur des préparations pures. Nous essayons actuellement de résoudre ce problème.

PLANCHE N° 14

Fig 1 :

Electrophorèse comparative de sidérophilines isolées à partir de LCR :

- A gauche : sidérophiline correspondant à la sidérophiline sérique
- A droite : sidérophiline propre au LCR

On note le début de dégradation de la sidérophiline de gauche (préparation en tampon véronal)

Fig 2 :

Préparation fraîches de sidérophilines de diverses origines :

- de gauche à droite : Les 2 sidérophilines du LCR
- La sidérophiline propre au LCR
- Un sérum témoin

Fig 3 :

Electrophorèse en gel d'amidon de sidérophilines sériques 3 jours après leur préparation, comparée aux mêmes sidérophilines traitées par la neuraminidase (sialidase)

- A gauche : préparation en tampon véronal
- A droite : préparation en tampon borate

Fig 4 :

Même expérience en immunoélectrophorèse

Fig 5 :

Immunoélectrophorèse et autoradiographie après usage d'un immunsérum standard :

- En haut : sidérophiline sérique et LCR
- En bas : sidérophilines du LCR (correspondant à celles de gauche de la figure 2)
- Sidérophiline propre au LCR

b) Etude de la dénaturation de la sidérophiline de type sérique (S_1) :

Nous avons été frappés par la difficulté que nous avons rencontré dans la conservation de la sidérophiline préparée en tampon véronal. Nous donnons nos résultats dans la planche 14. On remarque immédiatement l'analogie qu'il y a entre un aspect de dénaturation et un aspect obtenu par un traitement par la neuraminidase.

On retrouve en effet les mêmes bandes intermédiaires caractéristiques en gel d'amidon. Par ailleurs cette dénaturation ne se produit pas en tampon borate 0,2 M.

Nous ne pouvons nous expliquer encore ce phénomène.

III Les "post- γ " globulines :

Les "post- γ " globulines ont été étudiées par MACPHERSON et Coll. (1961) puis par HOCHWALD et THORBECKE (1962). Ces auteurs les ont caractérisées immunologiquement comme spécifiques du LCR. Ce sont LATERRE et HEREMANS qui ont étudié plus en détail cette protéine sans avoir pu néanmoins l'isoler des autres protéines spécifiques du LCR que LATERRE appelle "protéines tissulaires" (48). Si nous nous sommes plus spécialement attachés à l'étude des "post- γ " globulines c'est que l'électrophorèse en gel d'amidon nous en permettait une identification facile ; nous n'avions en effet à notre disposition aucun immunsérum qui nous aurait permis de les caractériser immunologiquement.

PLANCHE N° 15

Compte rendu d'ultra-centrifugations d'un mélange de " β traces"
et de "post- γ " (technique par absorption en ultraviolet).

C.N.R.S.

STATION CENTRALE D'ULTRACENTRIFUGATION

13, rue Pierre-Curie

PARIS (5^e)

Date : 11 MARS 1965.

Demandeur : Monsieur le Docteur MANUEL, Y

Adresse : Service de Monsieur le Professeur PAUFIQUE
Clinique Ophtalmologie - Pavillon C
HOPITAL Edouard HERRIOT - LYON. (Rhône)

COMPTE RENDU D'ESSAI : TECHNIQUE PAR ABSORPTION DANS L'ULTRAVIOLET

Substance : P γ + β traces

Solvant : Sérum Physiologique

pH : 7

D.O. : 1,00

Vitesse de régime en t min. : 59.780

Durée de démarrage, en min. et sec. : 24'

Température moyenne d'expérience : 20 °C

nature : standard

épaisseur en mm : 12

angle du secteur en degré : 4

A : temps compté à partir de l'établissement de la vitesse de régime (heures et min.)

B : temps de pose (sec.)

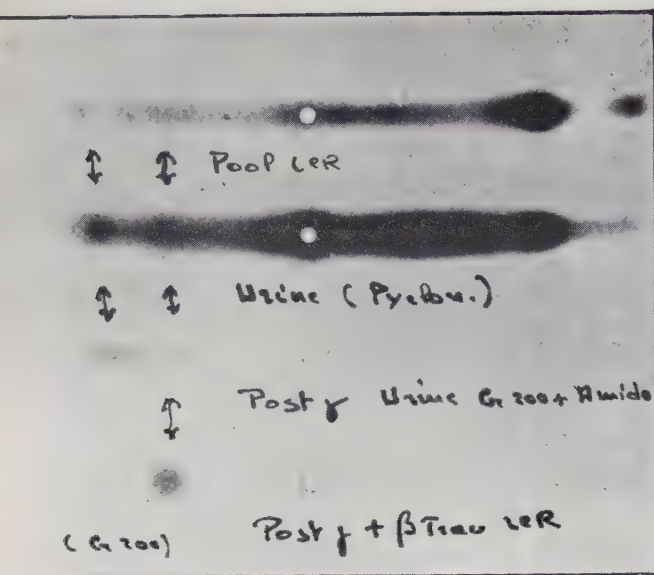
N°	A	B	A	N°
1	3'	30''	131'	9
2	19'	''	147'	10
3	35'	''		11
4	51'	''		12
5	67'	''		13
6	83'	''		14
7	99'			15
8	115'			16

INTERPRÉTATIONS :

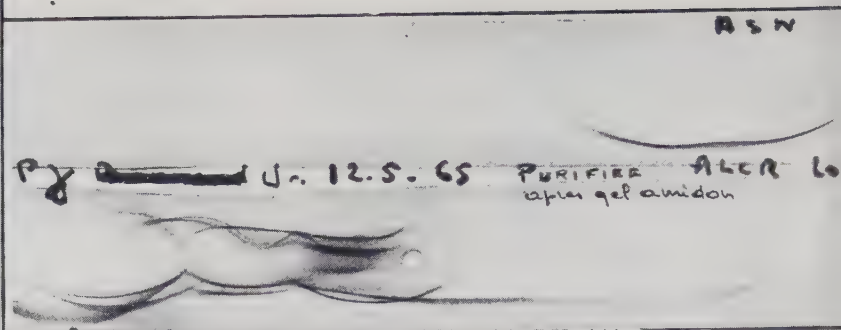
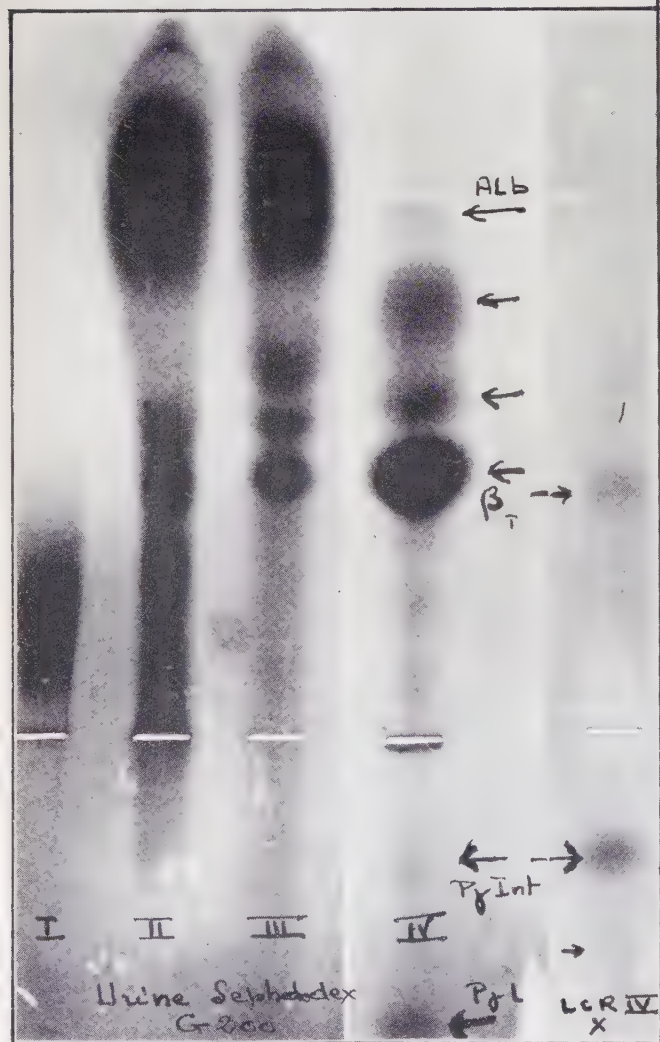
Un constituant apparent. Le coefficient de sédimentation à 20 °C est de 2,60 pour une concentration correspondant à une densité optique de 1,00, mais en fait la concentration réelle de l'ordre de 0,50. Un pic a été observé pendant l'accélération et a sédimenté ensuite.

Clichés N° 514

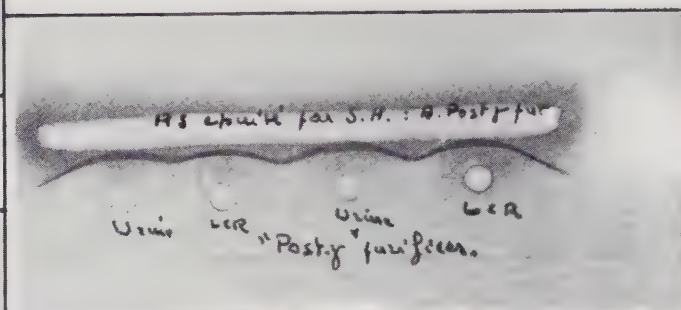
Bon N°



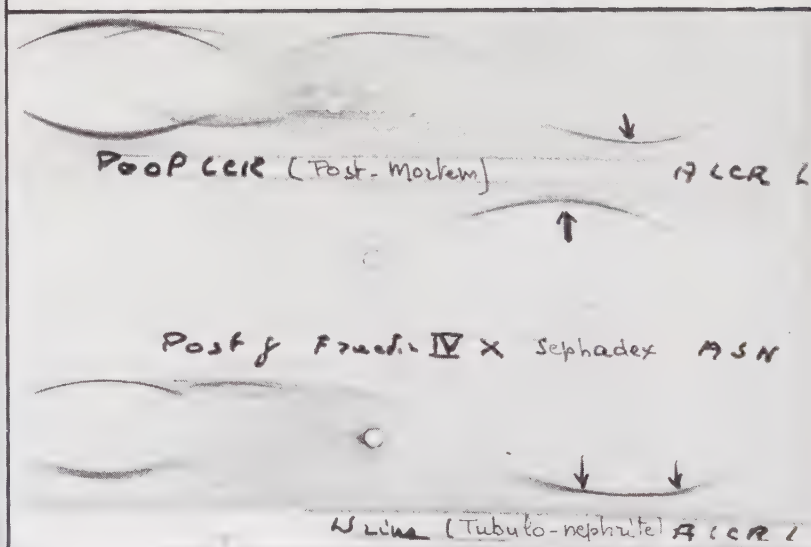
1



2



3



4

Recherches personnelles :

Dans l'impossibilité où nous étions de purifier des quantités suffisantes de cette protéine à partir du LCR, nous avons été obligés de purifier une protéine d'origine urinaire qui semblait être identique à celle du LCR. Les "post- γ " provenant du LCR et celles provenant de l'urine pathologique ont en effet les points communs suivants :

- même zone d'élution après gel filtration en Séphadex G 200
- même mobilité à toutes les techniques électrophorétiques utilisées. Elles présentent également la même faculté de changer de mobilité au cours de leur observation
- elles ne sont colorées ni l'une ni l'autre par la réaction de Mac MANUS ; elles ne seraient donc pas des glycoprotéines.
- Enfin et surtout elles ont une communauté antigénique absolue (Planche 16 fig. 3).

PLANCHE N° 16

Fig 1 :

Tests de pureté en gélose de la "post- γ " urinaire et comparaison de cette préparation avec la fraction de LCR ne contenant après gel-filtration que des " β traces" et des "post- γ ".

La préparation urinaire étant très fraîche et la préparation LCR ancienne on note la présence des fractions "post- γ " dans la préparation urinaire alors qu'il ne reste plus que le composant le plus rapide de la "post- γ " LCR.

Fig 2 :

Révélation par un immunosérum spécifique de la "post- γ " LCR d'une immuno-électrophorèse de la préparation de "post- γ " urinaire.

Fig 3 :

On note la communauté antigénique parfaite entre les "post- γ " urinaires et celles du LCR (immunosérum spécifique anti "post- γ " LCR).

Fig 4 :

Révélation par un immunosérum riche en anticorps anti "post- γ " LCR d'un LCR de cadavre, de la fraction IV de la figure 5 et d'une urine de tubulo-néphrite.

Fig 5 :

Etude par gel filtration d'une urine de tubulo-néphrite (Electrophorèse en d'amidon) et comparaison de la dernière fraction avec la fraction correspondante d'une gel filtration de LCR.

Tous ces arguments font que l'on peut valablement les identifier l'une à l'autre.

a) Ultracentrifugation :

Nous n'avons pu faire qu'un essai par suite de la petite quantité dont nous disposions alors. Par ailleurs, nous avons étudié un mélange de "post- γ " et " β traces". Notre concentration de travail était très faible puisqu'elle correspondait à une densité optique de 0,5 à 2 780 Å.

Pour cette concentration la constante de sédimentation obtenue est de 2,6.

Ce résultat est assez voisin de celui trouvé par LATERRE (2,4 S).

b) Composition en acides aminés :

Après traitement final par électrophorèse préparative en gel d'amidon nous avons pu obtenir 5 mg de "post- γ " purifiées d'origine urinaire. Nous expliquons plus haut ce qui nous permet d'extrapoler ces résultats au LCR.

La faible quantité de produit dont nous disposions ne nous a permis qu'une hydrolyse de 24 h.

Comme la précédente elle a été réalisée en tube scellé sous vide avec HCl Merck 6 N additionné de 0,06 % (P/V^o) de trichlorure de Titane. Malgré cette précaution l'hydrolysate contenait une quantité importante de substances charbonnantes. Ceci est dû à la quantité relativement importante d'amidon restant après élution. Toutefois après filtration l'hydrolysate qui avait été repris dans 7 ml était clair.

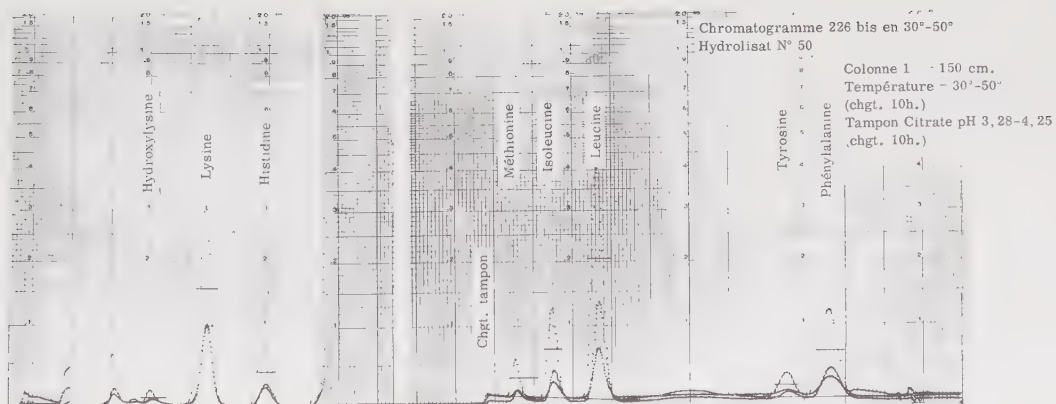
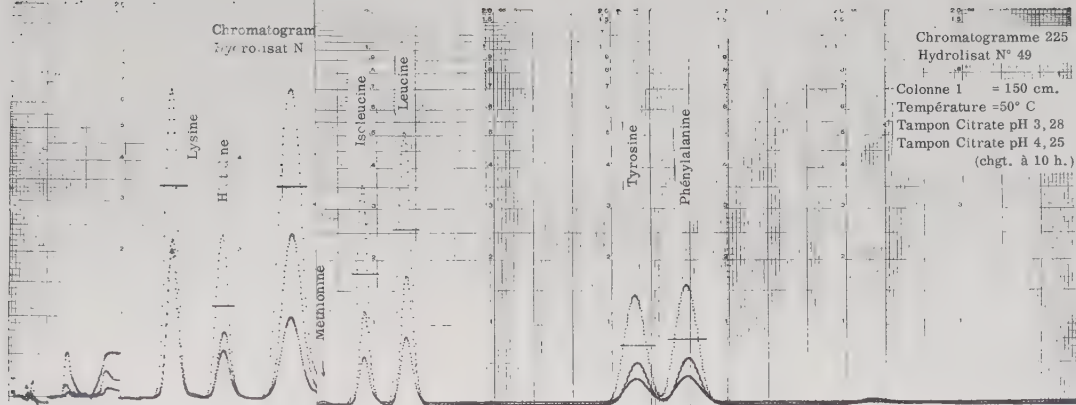
La chromatographie a été conduite à 2 températures différentes : 30 et 50° C. En effet l'hydroxyproline ne s'individualise qu'à 30° C.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de résidus pour 100 acides aminés (2ème tableau).

PLANCHE N° 17

Chromatogrammes des hydrolysats de Pré-albumine

et de "Post γ " globuline.



Ces résultats sont très particuliers : ils mettent en effet en évidence :

- la haute teneur en hydroxyproline (6, 93)
- la présence d'hydroxylysine (0, 50)
- l'absence de cystéine ou dérivés soufrés.

Or ces caractéristiques évoquent celles du collagène. Toutefois il faut noter un taux de glycoColle nettement inférieur (7, 37) et curieusement des taux d'hydroxylysine aussi inférieurs de presque exactement 50 % à ceux du collagène.

Ces résultats sont également à rapprocher du caractère holoprotéinique de cette protéine. Nous essayerons d'interpréter ces résultats quand nous discuterons des origines de ces protéines.

	24 H		
OH lysine	0, 50	Ac. Glutamique	12, 32
Lysine	7, 39	Proline	6, 44
Histidine	2, 64	Glycine	7, 37
NH ₃	3, 50	Alanine	5, 82
Arginine	7, 54	Valine	4, 55
Ac. Cystérique	néant	Cystéine	néant
Méthionine sulfoxyde	1, 99	Méthionine	0, 63
OH Proline	6, 93	Isoleucine	1, 60
Ac. Aspartique	9, 49	Leucine	6, 24
Méthionine sulfone	néant	Tyrosine	1, 01
Thréonine	4, 62	Phénylalanine	4, 12
Sérine	5, 27	Total	99, 97 %

Composition en Acides Aminés de la " Post γ " globuline urinaire
(taux exprimés en résidus pour 100 Acides Aminés)

COMPARAISON DE LA COMPOSITION PROTEIQUE DU LIQUIDE CEPHALORACHIDIEN AVEC CELLE D'AUTRES LIQUIDES BIOLOGIQUES

Il existe certains points communs entre les divers liquides biologiques que l'on trouve dans le corps humain. Ces liquides dérivent tous, plus ou moins, du sérum sanguin. Mais néanmoins ils ont tous des particularités qui font qu'ils diffèrent du sérum sanguin et qu'ils diffèrent entre eux.

Toutefois l'étude même de leurs points communs pourra se révéler intéressante, principalement en ce qui concerne l'origine de certaines particularités qu'ils ont par rapport au sérum sanguin.

Nous comparerons la composition protéique du liquide céphalorachidien avec celle des liquides endoculaires, des urines et de la sueur humaine.

I COMPARAISON AVEC LES LIQUIDES ENDOCULAIRES

Les liquides endoculaires se sont révélés particulièrement intéressants puisqu'ils présentent une parenté étroite quant à leur composition protéique avec le liquide céphalorachidien. C'est l'étude de l'un d'eux, le liquide sous-rétinien, qui nous a amené à pousser plus loin les investigations sur la composition protéique du liquide céphalorachidien. En effet, lors de notre thèse de médecine (1961) (49), nous avons commencé l'étude comparative des liquides sous rétiniens, de l'humeur vitré, donc de 2 liquides endoculaires avec le liquide céphalorachidien.

Si nos résultats étaient encore fragmentaires en ce qui concerne le liquide céphalorachidien et l'humeur vitré, les résultats obtenus sur le liquide sous-rétinien étaient déjà assez significatifs.

1°) Le liquide sous-rétinien :

Le liquide sous-rétinien a toujours été considéré comme un liquide d'origine pathologique, survenant au cours des décollements de rétine. Il apparaît entre l'épithélium pigmentaire et la rétine : il est donc en contact étroit avec une formation

d'origine purement nerveuse.

Après notre étude, il était possible d'affirmer certains points : on pouvait en effet définir un liquide sous-rétinien moyen comme contenant environ 2 g %₁₀₀ de protéines se répartissant en : pré-albumine, albumine, sidérophiline en gel d'amidon ; albumine et α I glycoprotéines ainsi que la sidérophiline en immunoélectrophorèse, avec comme caractéristiques : des γ globulines à un taux inférieur de 30 % à celui trouvé dans le sérum, une pré-albumine toujours plus importante que dans le sérum.

Malheureusement, nos techniques alors ne nous permettaient pas d'apprécier la présence ou l'absence de "post- γ " globulines. Enfin, nous n'avons jamais trouvé de ligne de sidérophiline avec sa double courbure en immunoélectrophorèse et nous n'avons jamais identifié en électrophorèse en gel d'amidon une deuxième sidérophiline.

Ce liquide semblait donc se présenter comme un liquide de filtration, avec en plus une production abondante de pré-albumine, puisque les taux de pré-albumine étaient sans aucune mesure avec les taux sériques correspondants. Suivant les cas pathologiques, la composition en γ globulines était variable, semblant dépendre étroitement de l'état des tissus sous-jacents.

2°) L'humeur vitrée

L'étude de l'humeur vitrée posait un problème particulier qui était celui de sa concentration en protéines. En effet, la teneur protéique de l'humeur vitrée est en moyenne comprise entre 0,10 et 0,15 g %₁₀₀ en protéines totales, teneur d'ailleurs relativement difficile à établir puisque les précipitants normaux des protéines précipitent également l'acide hyaluronique qui est un des composants majeurs de l'humeur vitrée. D'autre part les techniques de concentration (ultra - filtration ou dialyse) aboutissent à une concentration non seulement des protéines mais également à une concentration des grosses molécules d'acide hyaluronique présentes dans le vitré. Après de nombreux essais infructueux aboutissant à un concentrat d'une viscosité telle qu'il était impossible de les utiliser et d'obtenir une concentration suffisante. Nous avons essayé un traitement préalable par de la hyaluronidase pour scinder l'acide hyaluronique en petites molécules d'un poids moléculaire de l'ordre de 4000, éliminables par dialyse. Nous avons vérifié sur sérum témoin que la hyaluronidase ne modifiait en rien le tracé électrophorétique des protéines de ce sérum.

Grâce à ce traitement préalable par la hyaluronidase nous avons pu obtenir une concentration satisfaisante de l'humeur vitrée en protéines, de l'ordre de 30 à 40 g %₁₀₀.

Recueil du vitré :

Le vitré a été recueilli sur le cadavre dans des délais variant entre 4 et 6 heures après la mort. Les modifications rencontrées sont moins importantes que dans celles du liquide céphalorachidien ; cela tient au faible mouvement hydrique qu'il

Il y a normalement dans l'humeur vitrée compte tenu de la viscosité générale de ce liquide. Il semble donc que les perturbations relevées après la mort soient moins importantes dans l'humeur vitrée que dans le liquide céphalorachidien. Quoiqu'il en soit, la composition de l'humeur vitrée s'est révélée extrêmement intéressante.

A/ Electrophorèse sur papier

On retrouve dans l'humeur vitrée tous les composants déjà trouvés dans le liquide céphalorachidien. L'étude avec immunsérum anti-liquide céphalorachidien montre la présence d'une importante albumine et la présence de "post - γ " comme dans le liquide céphalorachidien. Les autres composants sont peut-être présents mais notre immunsérum ne les révèle pas.

B/ Immunoélectrophorèse

On retrouve dans l'humeur vitrée tous les composants déjà trouvés dans le liquide céphalorachidien montre la présence d'une importante albumine et la présence de "post- γ " comme dans le liquide céphalorachidien. Les autres composants sont peut-être présents mais notre immunsérum ne les révèle pas.

Electrophorèse en gel d'amidon

Le tracé est également comparable avec la présence d'une pré-albumine quoique en quantité relativement moins importante que dans le liquide céphalorachidien, une présence plus importante de séromucoïde α 1 et des traces d'haptoglobines

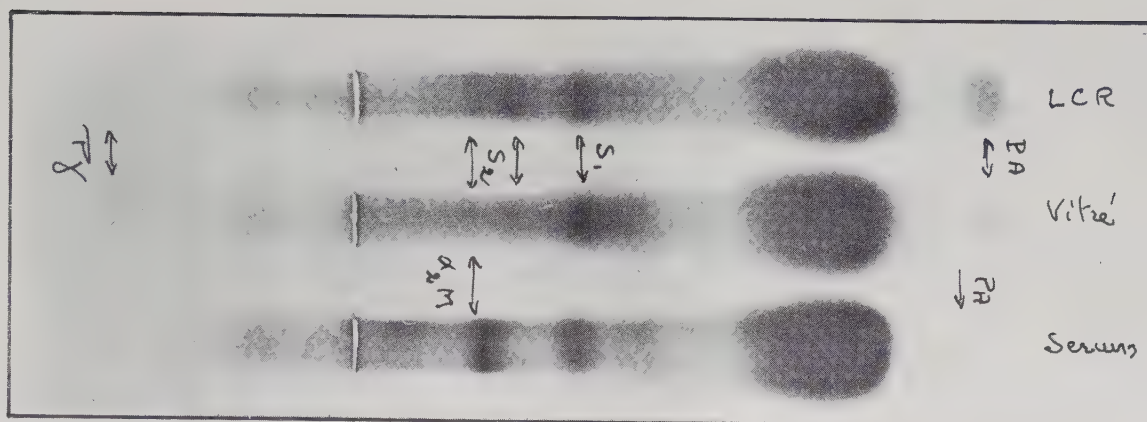
PLANCHE N° 18

Fig 1 .

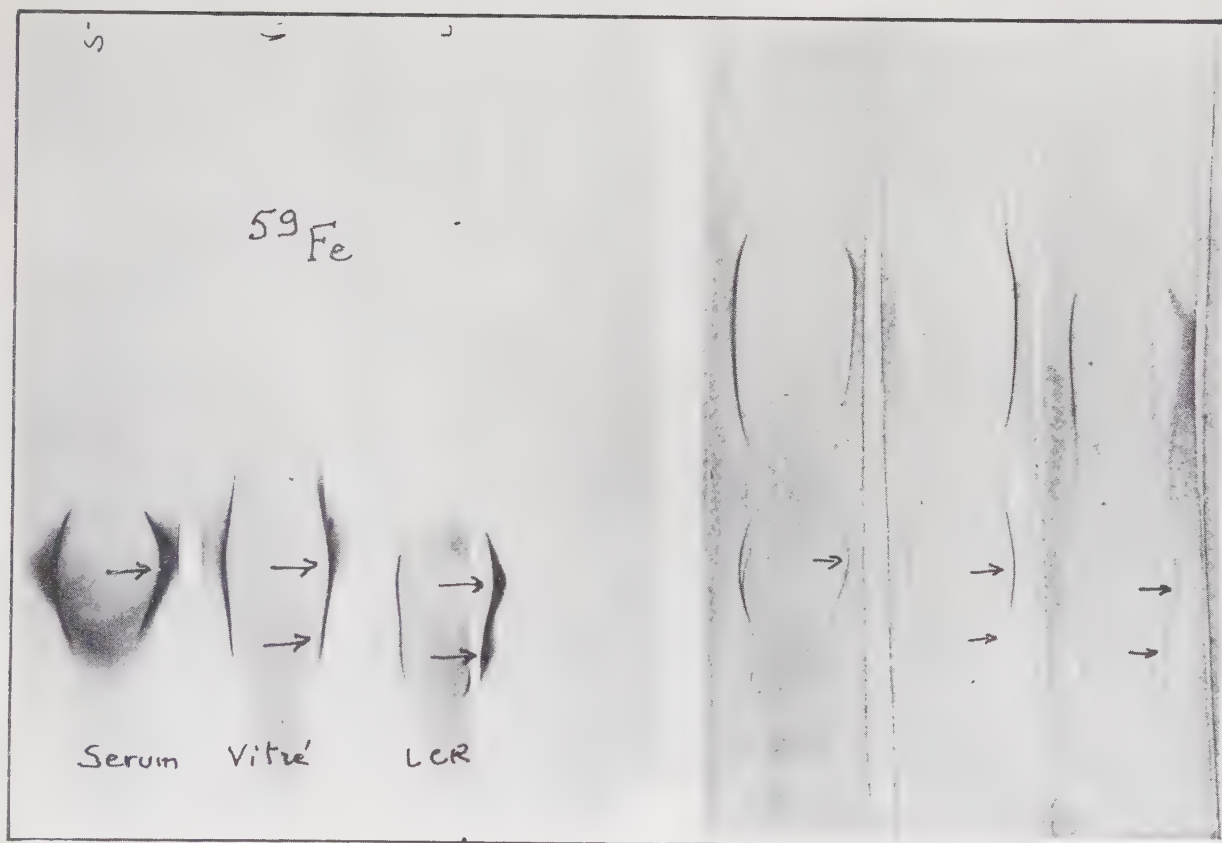
Etude comparative par électrophorèse en gel d'amidon de LCR, VITRE et Sérum.

Fig 2 .

Révélation par l'électrophorèse en gel d'amidon après diffusion intermédiaire en gélose (immunsérum standard), autoradiographie à gauche.
On note la présence d'une indiscutable ligne de sidérophiline dans le Vitre à double courbure.



1



2

comme dans le liquide céphalorachidien, une ligne transferrine normale, une ligne "slow α 2" globulines, correspondant à l' α 2 macroglobuline comme dans le liquide céphalorachidien, absence totale de ligne dans la zone β lipoprotéines, des γ peu importantes, enfin une trace à peine visible de "post- γ " globulines.

Dans la zone des haptoglobines de SMITHIES on trouve comme dans le liquide céphalorachidien une ligne qui semble correspondre à la deuxième transferrine.

Il était alors très intéressant de vérifier la nature même de cette ligne par immuno-diffusion à partir de gels d'amidon et par autoradiographie d'immuno-électrophorèse d'autre part.

Les résultats sont suffisamment nets pour permettre d'affirmer la présence de la deuxième sidérophiline déjà rencontrée dans le liquide céphalorachidien. Toutefois il est à noter une chose particulièrement importante c'est l'assez forte diminution du rapport transferrine modifiée sur transferrine normale dans l'humeur vitrée par rapport au liquide céphalorachidien. En effet, la quantité de transferrine modifiée est très nettement moins importante dans l'humeur vitrée que dans le liquide céphalorachidien (planche 18).

II COMPARAISON AVEC LES PROTEINES URINAIRES

Le problème de la composition protéique de l'urine normale, est un problème qui n'est pas encore complètement résolu. Quoiqu'il en soit il semble démontré à l'heure actuelle que la plupart des protéines plasmatiques se retrouvent dans les urines normales, mais dans des proportions fort différentes. En effet, si on retrouve l'albumine, l'orosomucoïde, ce dernier en quantité importante, et des γ globulines, par contre les autres composants n'y sont trouvés qu'à l'état de traces et pour les mettre en évidence, il faut arriver à des taux de concentration considérables.

Aux concentrations normales de travail : (3 à 4%) on ne trouve pratiquement aucun composant de poids moléculaire élevé. Par contre, et ceci est particulièrement visible en immuno-électrophorèse, certaines lignes apparaissent qui sont caractéristiques : 3 lignes principales correspondant dans la zone α 2 à ce que BERGGARD a décrit comme "une longue α 2 globuline", ce que LATERRÉ et HEREMANS ont décrit comme étant une " α 2 H S" globuline, isolée d'ailleurs par SCHULTZE dans le sérum normal et donc révélée par un immunsérum anti-sérum humain normal, et la ligne que dans nos travaux nous avons appelée la ligne " γ extérieure", appelée " γ U" par STEVENSON, " γ " par BERGGARD et qui ont une communauté immunologique entière avec les " γ G" mais une constante de sédi-

mentation égale à 3,5 S, ce qui explique d'ailleurs leur coefficient de diffusion important en gélose et donc l'aspect très extérieur de leurs lignes de précipitation (50).

Dans un récent travail, LATERRE et HEREMANS ont montré qu'il y avait dans les urines normales beaucoup d'autres lignes qui sont révélées par des immunsérums spécifiques anti-protéines urinaires et également révélées par des immunsérums spécifiques anti-liquide céphalorachidien (51).

D'autres auteurs ont montré que des immunsérums anti-extraits de reins pouvaient révéler également des fractions dans les urines. Nous n'avons pu personnellement étudier ces fractions faute d'immunsérums spécifiques valables.

Notre attention s'est plus particulièrement portée sur le problème de la "post- γ " globuline (δ a T de LATERRE et HEREMANS) ; or, nous ne trouvons jamais dans les protéines urinaires normales de "post- γ " globuline en gel d'amidon ; nous ne trouvons de "post- γ " que dans les syndrômes qui sont caractérisés par des affections portant sur le tubule rénal, tubulopathie congénitale en particulier (FALT 1962) (52). En effet, si l'on regarde les résultats que donnent LATERRE et HEREMANS, on s'aperçoit qu'ils ne peuvent révéler que des traces de "post- γ " par un immunsérum spécifique anti-LCR dans les urines normales.

Ceci est en accord avec le fait que nous ne trouvons jamais de "post- γ " dans les urines normales par électrophorèse en gel d'amidon. Il était dès lors intéressant de voir si la "post- γ " trouvée par contre en quantité très abondante dans les tubulopathies était la même que celle que l'on trouve à l'état physiologique dans le LCR normal. Grâce à un immunsérum de Chèvre anti-liquide céphalorachidien et révélant particulièrement bien la "post- γ " et à partir de concentrats urinaires de tubulopathies provenant d'insuffisance rénale en phase oligoanurique, nous avons pu observer qu'il révélait la "post- γ " urinaire, soit directement dans les urines soit directement dans la fraction terminale de la gel filtration en Séphadex G 200. Cette fraction post-albuminique en Séphadex G 200 présente d'autres particularités comme le montre bien la figure : présence de β caractéristiques, de post-albumine. (Planche 16).

Par ailleurs le vieillissement de la "post- γ " fait apparaître une "post- γ " intermédiaire qui possède une communauté antigénique totale avec la "post- γ " lente (planche 16).

En conclusion, les 2 "post- γ " lente et intermédiaire sont identiques en immuno-électrophorèse quelle que soit leur origine : LCR et urine. Et de plus leur identité immunologique est complète ainsi que leur niveau d'élution en Séphadex G 200. Ces faits confirment ce que nous soupçonnions dans une publication de 1962 (53).

C'est ce qui nous a permis de commencer à partir de ce nouveau matériel, la purification de cette "post- γ " en vue de notre étude analytique.

III COMPARAISON AVEC LA SUEUR HUMAINE

Il nous a paru intéressant d'étudier la composition protéique de la sueur humaine par les mêmes techniques que celles que nous avons utilisées jusqu'ici pour les liquides céphalorachidiens et les urines (54).

La sueur que nous avons utilisée provenait d'une soixantaine d'individus d'une moyenne d'âge de 20 ans, et avait été recueillie selon la méthode décrite par LACOUR. Les sujets préalablement couchés dans un sac en plastique siliconé et mis sous une couverture chauffante pendant une heure et demie à 2 heures. La sudation est entretenue par administration de tisane chaude. La quantité de sueur ainsi recueillie varie d'un individu à l'autre de 80 à 500 ml. De cette manière, il a été possible d'obtenir environ une quinzaine de litres de sueur. Les taux protéiques ont été mesurés de la même façon que pour le LCR ainsi que la concentration qui a été menée de la même façon par dialyse contre une solution à 60 % de polyéthylène glycol ce qui nous a permis d'arriver à des concentrations de l'ordre de 4 000 fois. Les résultats obtenus par les divers techniques décrites ci-dessus ont démontré une composition très caractéristique et très particulière de la sueur. En effet, on note :

1°) La très faible quantité de protéines ayant une communauté antigénique avec les protéines sériques et parmi celles-ci une plus faible quantité ayant une morphologie comparable à celle des protéines sériques. Il y a en effet de l'albumine, des traces de sidérophiline bien qu'une autoradiographie après saturation en ^{59}Fe ne nous ait jamais montré de ligne caractéristique. En fait un immunsérum anti-sidérophiline arrive à montrer l'existence d'une trace de cette protéine qui a peut-être perdu sa capacité fixatrice en Fer.

2°) L'absence de toute fraction non protéique de poids moléculaire supérieur à celui de l'albumine.

3°) La quantité considérable de protéines de poids moléculaire peu élevé inférieur en tous les cas à celui de l'albumine. Ce dernier point a particulièrement été mis en évidence par la gel filtration en Séphadex G 200. La gel filtration sur Séphadex montre en effet, que sur les 4 fractions obtenues, 3 fractions se trouvent après l'albumine, seule la fraction 1 comprenant des protéines d'origine plasmatique (planche 19).

En effet, dans la fraction I nous trouvions une fraction albuminique très nette, bien délimitée, homogène, une trace de fraction pré-albuminique qui semble avoir une mobilité qui la situe entre les 2 pré-albumines sériques : séromucoïde α 1 et pré-albumine riche en tryptophanne. Deux autres composants sont identifiés l'un entre les zones "fast- α 2" et "post- γ " globuline, l'autre juste en arrière dans la zone β_c , sidérophiline. Au niveau de la zone β_c , il y a une très discrète condensation qui pourrait être la sidérophiline, ceci en gel d'amidon.

La fraction II montre des traces d'albumine et des protéines dans les zones déjà décrites, en positions "fast- α 2", à part un nouveau composant qui migre dans la zone haptoglobines de SMITHIES, entre la "slow- α 2" et la β_c .

La fraction III est très intéressante puisqu'on y trouve la presque totalité des pré-albumines caractéristiques de l'électrophorèse en gel d'amidon de la sueur et un composant migrant juste en arrière de la zone β_c .

Enfin, et surtout, il apparaît de façon très individualisée 2 compo-

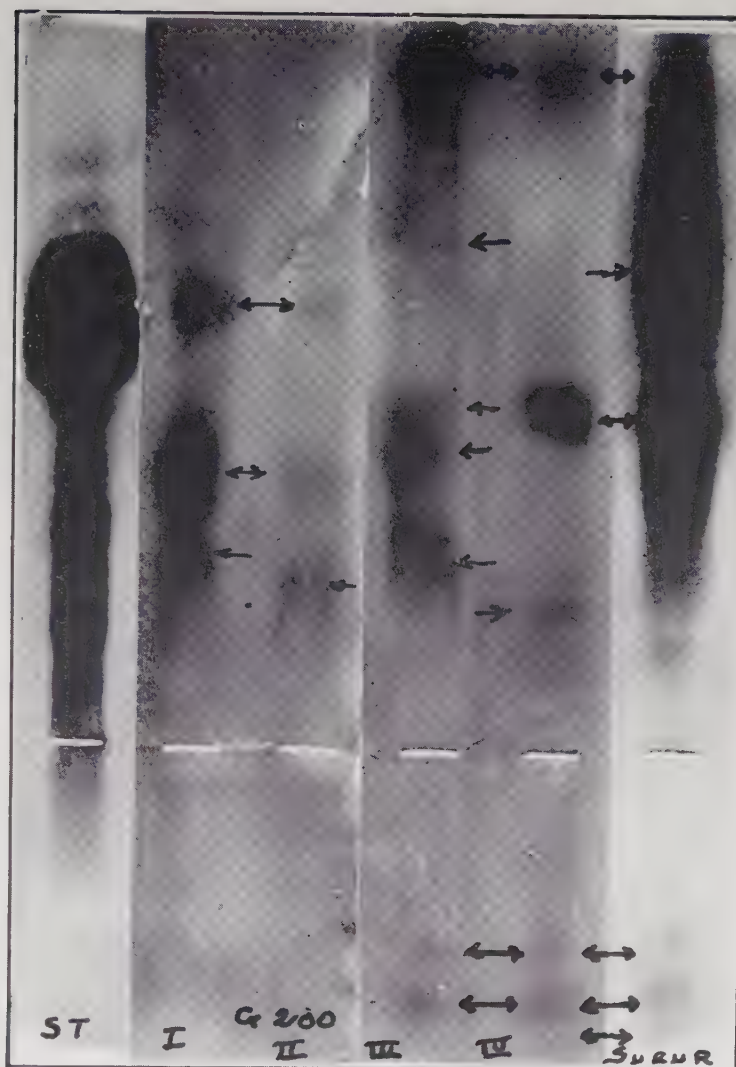
PLANCHE N° 19

Fig 1 :

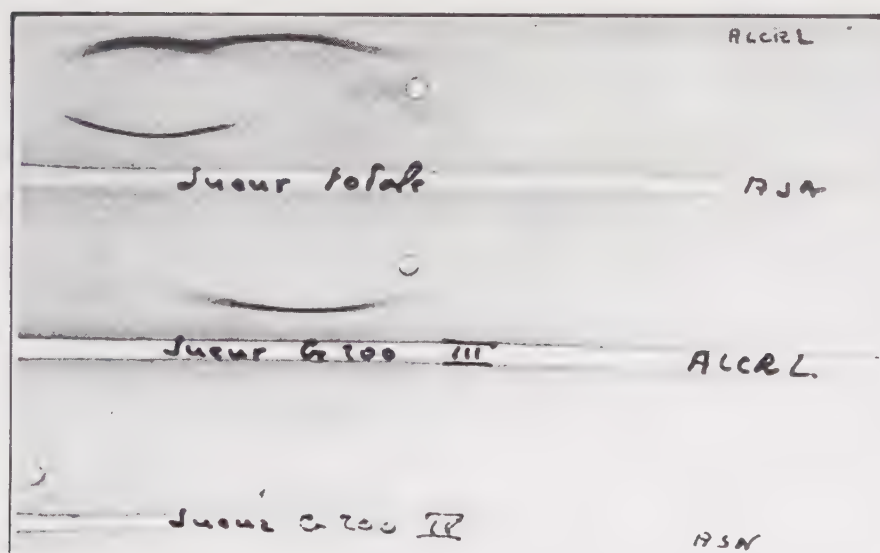
SUEUR gel filtration de "pools" de sueur après concentration 3 000 fois.
(Electrophorèse en gel d'amidon) : à droite sueur totale.

Fig 2 :

Sueur totale et les fractions III et IV révélées en haut par un immunsérum standard, en bas par un immunsérum riche en anticorps "post- γ " LCR.



1



2

sants "post- γ " les plus rapides.

Dans la fraction IV on note en plus un troisième composant "post- γ " globulinique.

L'analyse immuno-électrophorétique par un immunosérum standard montre que seules les fractions I et II contiennent des composants qui réagissent avec un immunosérum anti-protéines sériques.

Les "post- γ " des fractions III et IV ne réagissent pas avec un immunosérum anti LCR révélant les "post- γ " du LCR.

Ainsi donc, si l'on compare ces résultats avec ceux obtenus avec des protéinuries physiologiques, on s'aperçoit qu'il y a des différences importantes entre les 2 compositions protéiques, puisque l'on retrouve dans les protéinuries physiologiques des globulines de haut poids moléculaire et que par ailleurs la plupart des globulines sériques ont été retrouvées dans cette protéinurie.

Par contre dans les affections tubulaires pures que nous avons envisagées, apparaissent des fractions qui morphologiquement semblent avoir beaucoup de points communs avec les fractions qui caractérisent les protéines de la sueur : ces fractions semblent aussi pouvoir se comparer avec certaines fractions caractéristiques que l'on a définies sous le terme de " β trace" et de "post- γ " globuline.

Il était donc intéressant d'essayer de voir s'il y avait une identité entre ces divers composants. Nous n'avons malheureusement pas eu à notre disposition d'immunosérums permettant de révéler des " β traces", mais par contre, l'immunosérum qui révélait fort bien dans les urines d'origine tubulaire et dans les LCR les "post- γ " globulines, ne révèle par contre, rien dans une des quelconques fractions de la sueur.

Il semble donc que les "post- γ " rencontrées dans la sueur soient encore différentes de celles rencontrées dans certaines urines comme dans les liquides céphalorachidiens.

Par contre, on trouve dans la sueur des quantités notables "d' α H S". Il faut signaler enfin que, dans la sueur il semble y avoir au niveau des "post- γ " globulines une ligne qui est colorée par la réaction de Mac MANUS (acide per-iodique - réactif de SCHIFF), ce qui semblerait dire que ces "post- γ " de la sueur sont des glycoprotéines. Or, nous avons vu que dans le liquide céphalorachidien aussi bien que dans les urines, ces substances ne sont pas colorées par la réaction de Mac

MANUS.

Autres liquides biologiques

Nous avons essayé de voir si nous trouvions dans d'autres liquides biologiques les mêmes protéines que LATERRE nomme protéines tissulaires.

Notre manque d'immunsérum spécifique a fait que seule l'électrophorèse en gel d'amidon par la caractérisation qu'elle donne des "post- γ " globulines, nous permettrait d'apprécier l'absence ou la présence en quantité notable de "post- γ " globulines.

Dans aucun autre liquide biologique, nous n'avons retrouvé de "post- γ " globulines, que ce soient les liquides d'ascite, que ce soient les liquides de bulles intradermiques, dans les liquides pleuraux ou dans les liquides synoviaux.

Par contre dans nombre de ces liquides nous avons trouvé une ligne extérieure aux β_2 que nous avons pu identifier comme étant des produits de fibrynolyse (55), ligne que nous avons retrouvée dans certains liquides céphalorachidiens mais tous pathologiques. Nous n'avons jamais trouvé cette ligne dans les liquides céphalorachidiens normaux. Ceci rejoint d'ailleurs les conclusions de LATERRE à ce sujet (56).

ETUDE COMPARATIVE DES MODIFICATIONS QUE SUBIT LA SIDEROPHILINE DU
LIQUIDE CEPHALORACHIDIEN DE CERTAINS ANIMAUX :
LE SINGE BABOIN, LE CHIEN ET LA CARPE.

I LE SINGE BABOIN

a) Matériel

Nous avons pour cette étude prélevé des liquides céphalorachidiens de 35 singes Babouins, ce prélèvement étant accompagné en même temps d'un prélèvement de sérum.

Le prélèvement s'est effectué sur des singes Babouins de 10 à 15 kg environ ; nous avons prélevé du liquide céphalorachidien et du sang sur deux autres espèces de singe : les Cinocéphales et les Patas, mais ceux-ci ne donnaient qu'une trop faible quantité de liquide et nous avons limité notre étude au sérum et au liquide céphalorachidien du singe Babouin.

Le prélèvement a été effectué après anesthésie de l'animal par une bouffée de chloroforme. Le sang est alors recueilli par section des vaisseaux du cou. Le liquide céphalorachidien a été retiré par ponction sous-occipitale. Pour cette ponction nous avons utilisé un trocart n° 6 ou 7. Le repère osseux était la ligne médiane au ras de la première vertèbre cervicale. La tête était hyperfléchie en décubitus latéral et la pénétration du trocart de 2,5 cm à 3 cm environ. Après avoir traversé la paroi membraneuse atloïdienne on atteint le quatrième ventricule. Le liquide céphalorachidien s'est écoulé goutte à goutte, parfois rosé au début du fait d'un accident de ponction puis parfaitement clair ensuite. Le liquide est aspiré lentement à la seringue sèche jusqu'à épuisement.

Les liquides ont ensuite été mélangés et conservés à + 4° sous azothydrate de sodium au taux de 1/10 000. Chaque ponction a permis de recueillir environ 4 à 5 ml de liquide céphalorachidien ce qui nous a permis de collecter, compte tenu des pertes, 100 ml de liquide céphalorachidien. Nous avons concentré ce liquide

céphalorachidien par les techniques décrites ci-dessus et nous l'avons étudié comparativement à des mélanges de sérums pour éliminer les variations génétiques des transferrines. Parallèlement nous avons purifié en partie de la sidérophiline de Singe à partir du sérum.

b) Description du liquide céphalorachidien de Singe

Les taux protéiques étaient toujours proches de $0,50 \text{ g}^\circ/\text{oo}$, donc nettement supérieurs à ceux du LCR humain normal.

Comme le liquide céphalorachidien humain, le liquide céphalorachidien de Singe est enrichi en pré-albumine par rapport à son sérum ; nous n'avons pu mettre en évidence par contre de "post- γ " globuline comme dans le liquide humain par électrophorèse en gel d'amidon, mais un immunosérum spécifique révèle une "post- γ " à double courbure de mobilité toutefois beaucoup plus élevée que chez l'homme.

Par ailleurs il ne semblerait pas exister en amidon de seconde transferrine.

PLANCHE N° 20

Fig 1 :

A droite : Immunoélectrophorèse de L.C.R. et de sérum de Babouin (Immunosérum standard)

A gauche : La même immunoélectrophorèse mais révélée par autoradiographie après marquage de la sidérophiline par ^{59}Fe .

Fig 2 :

A gauche : Immunoélectrophorèse comparative de - fraction riche en sidérophiline de Babouin

- la même fraction

après traitement à la Neuraminidase

- un sérum de Babouin

A droite : La même immunoélectrophorèse révélée par autoradiographie après marquage de la sidérophiline au ^{59}Fe .

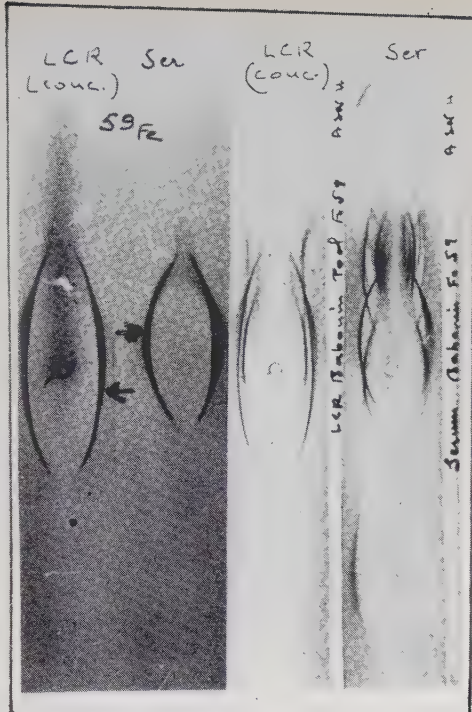
Fig 3

Même étude mais par électrophorèse en gel d'amidon

Fig 4

A gauche : Electrophorèse en gel d'amidon d'un "pool" de L.C.R. de Babouin concentré.

A droite : Par comparaison : préalbumine de L.C.R. humain purifiée

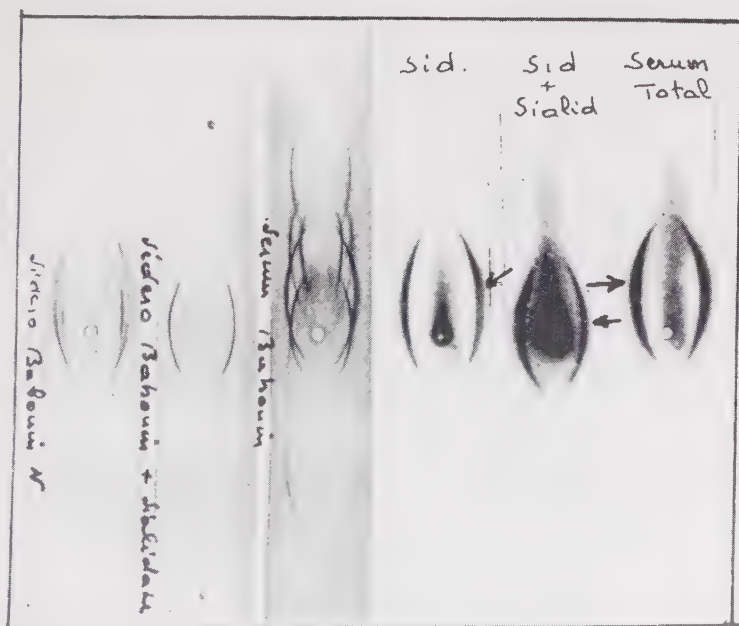


1

P. Alb
Humalus

LCR
Babouin

4



2



3

PLANCHE N°21

Fig 1 :

Electrophorèse en gel d'amidon :

A droite : Electrophorèse de LCR et de Sérum de chien.

A gauche : La même mais après révélation par autoradiographie.

Fig 2 :

Immuno-électrophorèse :

A droite : Sérum et LCR de Chien (Immunsérum de lapin antisérum de Chien).

A gauche : La même révélée par autoradiographie après marquage de la sidérophiline par ^{59}Fe .

On note la présence d'une ligne supplémentaire nettement en avant de la ligne sidérophiline principale, cette dernière étant légèrement décalée par rapport à son homologue sérique.

Fig 3 :

Electrophorèse en gel d'amidon révélée par un immunsérum antichien après diffusion intermédiaire dans une plaque de gélose :

Au-dessus : révélation à l'azo-carmin.

Au-dessous : révélation par autoradiographie après marquage au ^{59}Fe .

On note le recul de la principale ligne sidérophiline par rapport à son homologue sérique, la ligne qui présente en plus une double courbure correspondant aux 2 lignes apparues en gel d'amidon (cf. fig. 1) et l'apparition d'une ligne de mobilité beaucoup plus rapide.

Fig 4 :

Immunoélectrophorèse : même expérience que dans la fig. 2 mais avec de la sidérophiline de Chien traitée par la neuraminidase :

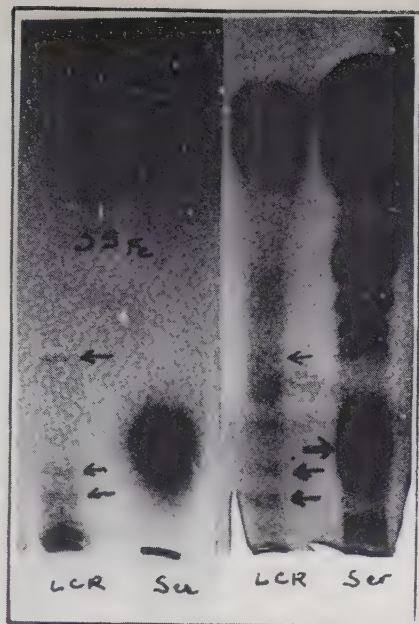
On note l'apparition d'une très nette ligne de mobilité plus rapide après autoradiographie alors que la ligne principale est nettement ralentie.

Fig 5 :

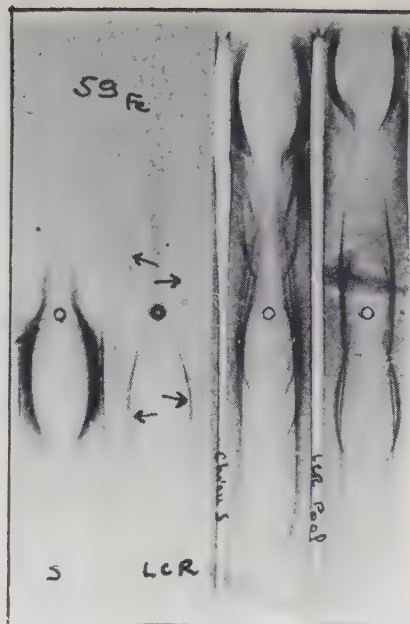
Même expérience que dans la fig. 4 mais en électrophorèse en gel d'amidon. La ligne migrant en avant n'est pas retrouvée la concentration obtenue étant insuffisante. Les autoradiographies n'ont pas été interprétables pour la même raison.

CONCLUSION : Il y a identité parfaite entre les modifications de la sidérophiline dans le LCR de chien et celles obtenues après traitement par la neuraminidase. Cette identité est particulièrement frappante en immunoélectrophorèse après autoradiographie.

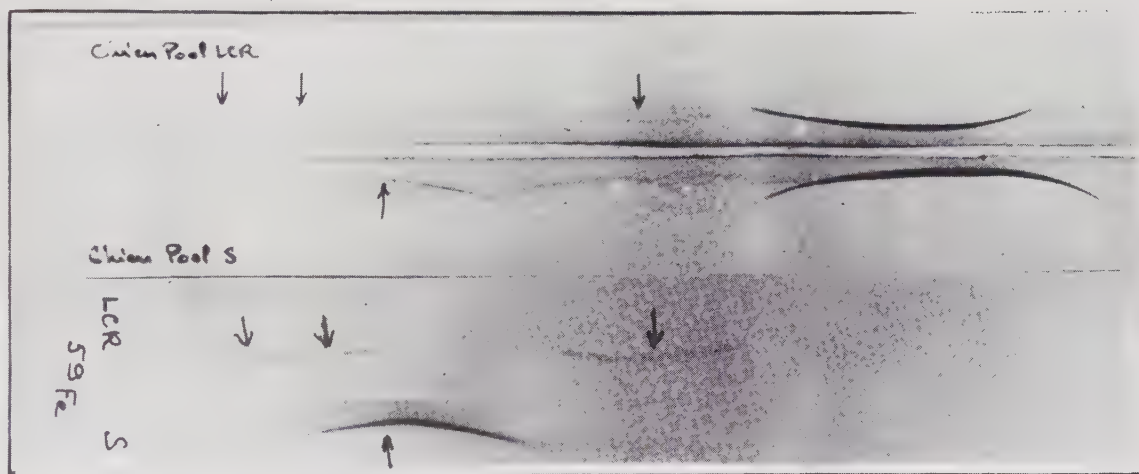
CHIEN



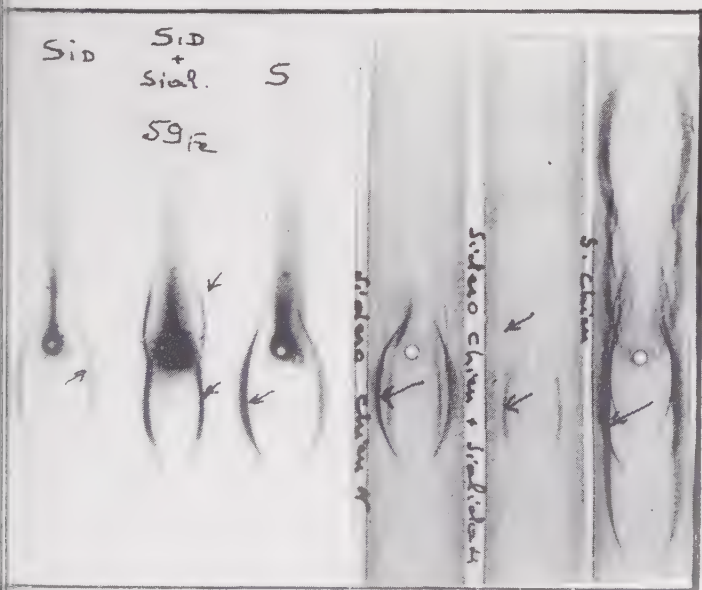
1



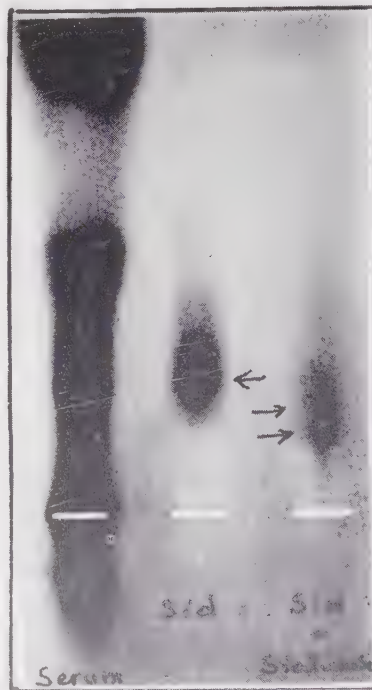
2



3



4



5

En immuno-électrophorèse et après auto-radiographie en effet, la transferrine du liquide céphalorachidien a la même mobilité que la transferrine du sérum de Singe correspondant.

En électrophorèse sur gel d'amidon et après révélation sur auto-radiographie on ne trouve également aucun changement de mobilité et apparition d'aucune trace de double courbure quelle qu'elle soit, il semble donc que chez le Singe Babouin il n'y ait qu'une transferrine décelable.

c) Action de la neuraminidase

Pour vérifier si le comportement de la sidérophiline du Singe changeait de façon équivalente à la sidérophiline humaine traitée par la neuraminidase, nous avons traité par la neuraminidase dans les mêmes conditions que celles décrites pour la sidérophiline humaine, la sidérophiline de Singe que nous avons en partie purifiée. Nous n'obtenons qu'un très petit changement de mobilité après traitement à la neuraminidase. La sidérophiline de ce singe serait donc peu sensible à l'action de cet enzyme. Ceci est tout à fait inhabituel puisque, nous le verrons pour le Chien, les choses se passent différemment.

II LE CHIEN

Nous avons ponctionné 10 chiens. Ils pesaient de 12 à 16 kg en moyenne. Nous opérions sur des chiens anesthésiés depuis la veille et à jeûn. L'anesthésie était faite au Nesdonal intra-veineux (environ de 4 à 6 ml).

Le Chien était rasé sur l'occiput et dans la région cervicale. On ne commençait à opérer qu'après apnée car les risques d'accident étaient importants et pouvaient aller jusqu'à la mort.

La ponction était sous-occipitale et faite à l'aide d'un trocart N° 8. Nous avons employé la même technique que pour ponctionner les singes et nous retirions 10 ml environ de liquide céphalorachidien par ponction. Après le recueil du liquide nous avons injecté 5 ml de soluté isotonique de ClNa.

Le taux protéique général du liquide céphalorachidien de Chien était de l'ordre de 0,40 à 0,50 g / ‰ .

Nous avons pu ponctionner jusqu'à cinq fois le même animal à des intervalles de 6 à 10 jours ; au réveil les Chiens présentaient toujours des troubles de la

statique et de l'équilibration qui régressaient en 24 heures.

Nous avons vérifié que ce liquide céphalorachidien n'était pas contaminé par le sérum : il ne donnait pas de réaction à la benzidine.

Le volume de liquide céphalorachidien obtenu a atteint une centaine de ml comme pour le Singe. Ce liquide a été concentré de la même façon que le liquide céphalorachidien humain. Enfin, parallèlement avec la même technique que pour le Singe, nous avons purifié de la sidérophiline sérique de Chien.

Résultats :

a) Nous n'avons trouvé chez le Chien aucune fraction pré-albuminique, ceci en accord avec les travaux de HAUSER (56). La composition du liquide céphalorachidien est toutefois peu différente de celle du sérum. Par contre, les modifications sont très importantes lorsqu'on considère la sidérophiline. En effet, par auto-radiographie on révèle en immuno-électrophorèse 2 bandes de sidérophiline : une de mobilité supérieure à la sidérophiline correspondant à celle du sérum, une de mobilité inférieure à celle du sérum ; aucune bande correspondant à la sidérophiline sérique n'est notée.

Le gel d'amidon montre 2 fractions sidérophilines, une rapide qui semble migrer dans la zone des β_c de SMITHIES, zone qui correspond aux haptoglobines chez le Chien, une beaucoup plus lente migrant en arrière de la sidérophiline dont la bande est très caractéristique chez le Chien et semblant présenter une hétérogénéité par l'amorce d'une double courbure après analyse immunologique du gel d'amidon. L'autoradiographie directe fait aussi soupçonner la présence de 2 composants.

b) Action de la neuraminidase

Après traitement par la neuraminidase de la sidérophiline de Chien partiellement purifiée, on a la surprise de voir apparaître toutes les fractions sidérophilines correspondant aux fractions sidérophilines du liquide céphalorachidien de Chien.

En effet, contrairement à ce qui se passe pour la sidérophiline humaine 2 fractions changent de mobilité avec toutefois une différence importante : la mobilité est accélérée pour l'une au lieu d'être diminuée comme il est de règle dans les glycoprotéines humaines. La réaction est en fait légèrement plus complexe puisque si une première fraction change de mobilité dans le sens de l'accélération, une deu -

xième fraction par contre, change de mobilité dans le sens d'un ralentissement. De plus cette deuxième fraction semble également se dédoubler en 2 composants.

Lorsque nous avons commencé cette étude, nous avons été surpris par l'originalité des fractions sidérophiliques dans le liquide céphalorachidien du Chien par rapport au sérum correspondant.

Cette originalité nous avait fait penser qu'il était difficile d'expliquer la formation de sidérophilines particulières par une simple action neuraminidasique. L'expérimentation nous a montré au contraire que l'action de la neuraminidase reproduisait très exactement les modifications spécifiques du liquide céphalorachidien. Ce point est très important quant à l'origine des transferrines particulières au liquide céphalorachidien, comme nous le verrons plus loin.

III LA CARPE

Le liquide céphalorachidien de Carpe est assez différent du sérum de Carpe. Comme chez l'Homme, il est pauvre en éléments macro-moléculaires. Dans une première analyse il pourrait sembler que pour la fraction qui nous intéresse : fraction sidérophilique ; elle soit identique dans le liquide céphalorachidien et dans le sérum. C'est en effet ce que nous montrent tous les examens que nous avons pu faire sur les liquides céphalorachidiens de Carpe. Toutefois, l'immuno-diffusion après gel d'amidon avec révélation par un immunsérum spécifique anti-sérum de carpe, nous a montré l'existence dans le liquide céphalorachidien de Carpe suffisamment concentré, d'une ligne de mobilité inférieure à la mobilité de la transferrine normale qui était capable de fixer du Fer, ce que démontraient parfaitement les autoradiographies avec ^{59}Fe . Il semble également que la communauté antigénique de ces 2 lignes : ligne correspondant à la sidérophiline normale et ligne correspondant à cette deuxième ligne fixant le Fer, ne soit pas totale puisque, une partie de ces 2 lignes se raccorde et une autre partie se croise, phénomène correspondant un peu à ce que l'on voit entre les γA et les γG globulines chez l'homme. Ce fait très visible sur l'autoradiographie nous a fait poser la question d'une deuxième transferrine. Nous n'avons plus, au moment où nous avons fait cette étude, de sidérophiline de Carpe pure. Toutefois RICHARD (57), après de nombreux essais n'a jamais pu modifier la sidérophiline de Carpe par action de la neuraminidase.

CONCLUSIONS :

Chez les Mammifères que nous avons pu étudier : Chiens et Singes Babouins, le seul animal qui ne semble pas présenter de sidérophiline propre à son liquide céphalorachidien est le singe Babouin, mais, parallèlement à ce fait il est le seul également dont la mobilité de la transferrine sérique ne soit pratiquement pas affectée par un traitement à la neuraminidase.

Le Chien par contre présente de nombreuses particularités sidérophiliques dans son liquide céphalorachidien, mais comme nous l'avons vu ces particularités sont parfaitement reproduites par l'action de la neuraminidase sur la sidérophiline correspondante.

Le problème de la Carpe est plus délicat à expliquer et mérite une étude plus approfondie. Quoiqu'il en soit il y a une différence entre les sidérophilines du liquide céphalorachidien et la sidérophiline sérique de Carpe. Cette différence est indiscutable et elle semble être autre chose qu'une simple différence portant sur l'enlèvement d'un acide sialique en bout de chaîne.

Nous commençons d'ailleurs une étude particulière à ce sujet.

ORIGINE DES PROTEINES DU LIQUIDE CEPHALORACHIDIEN

Il est évident que la plupart des protéines de liquide céphalorachidien trouvent leur origine dans le sérum sanguin et ce par un processus de filtration. FRICK (58), avec des perfusions d'albumine et de γ globulines, a parfaitement démontré ce fait. Toutefois certaines particularités méritent d'être notées.

En effet, qu'il dit filtration dit sélection en fonction du poids moléculaire. Or on trouve dans le liquide céphalorachidien des quantités extrêmement faibles de γ globulines 7 S, alors que l'on trouve toujours des α 2 macro globulines de poids moléculaire de l'ordre de 800 000. Les haptoglobines de poids moléculaire compris entre 90 000 et 150 000 n'existent qu'à l'état de trace, alors que la céruloplasmine est présente en quantité notable tout au moins dans un rapport relatif plus important qu'elle n'existe dans le sérum.

L' α 1 3,5 anti-trypsine est présente en très grosses quantités alors que, l'orosomucoïde de poids moléculaire légèrement inférieur semble présent en quantité moins importante que dans le plasma. ROSENTHAL et SOOTHIL (59) ont essayé d'expliquer ces anomalies en dosant par des immunsérums spécifiques, le rapport de ces protéines dans le liquide céphalorachidien et dans le sérum sanguin.

Ils comparent ensuite ce rapport à celui des protéines totales entre ces deux liquides. Leurs résultats sont intéressants et parfaitement convaincants dans l'étude des protéinuries de type filtration sélective, toutefois dans le liquide céphalorachidien il reste très difficile d'expliquer les anomalies, notamment en ce qui concerne la faible quantité d'orosomucoïde. Nous reviendrons sur ce problème. Enfin, la pré-albumine riche en tryptophane se trouve dans les liquides céphalorachidiens dans des quantités incomparablement plus élevées que dans le sérum sanguin, ce fait sera discuté plus loin. De plus, il faut signaler la présence d'une quantité importante de sidérophiline, en précisant toutefois que si l'on considère la sidérophiline correspondant à son homologue sérique, la proportion est à peu près respectée

mais la présence de la deuxième sidérophiline particulière au liquide céphalorachidien pose un problème cette fois-ci tout particulier. La présence de cette protéine qui n'a pas d'équivalent dans le sérum nous amène également à considérer les autres protéines du liquide céphalorachidien qui n'ont également pas d'équivalent dans le sérum, protéines que LATERRE appelle protéines tissulaires (60).

Il y a donc dans cette filtration un phénomène qui semble n'être pas seulement passif mais très certainement actif. Filtration sélective ? Sécrétion ? Réabsorption sélective ? Les phénomènes sont-ils combinés ? Il est encore difficile de répondre, la seule chose que l'on puisse affirmer est que ce phénomène est certainement beaucoup plus complexe que les premiers auteurs ne l'avaient cru ; d'autant qu'il est possible d'envisager une production de certaines fractions protéiques à partir même du tissu cérébral.

Cinq fractions attireront plus particulièrement notre attention soit que ces fractions se retrouvent dans le liquide céphalorachidien à des concentrations différentes de celles du sérum, soit qu'elles ne se retrouvent pas dans le sérum. Ce sont respectivement dans l'ordre dans lequel nous les envisageons :

1°) Les protéines que l'on peut retrouver dans le sérum : le séromucoïde $\alpha 1$, les γ globulines, la pré-albumine, les transferrines.

2°) Les protéines que l'on ne retrouve pas dans le sérum et parmi elles, celles que nous avons pu étudier : les "post- γ " globulines.

Pour étudier ces problèmes nous utiliserons chaque fois que cela nous paraîtra utile les données de la pathologie.

I LE SEROMUCOÏDE $\alpha 1$

Comme nous l'avons vu à propos de l'étude de cette protéine l'avis des auteurs reste partagé quant à la teneur des liquides céphalorachidiens en cette protéine. Certains, dont nous sommes, pensent que le séromucoïde $\alpha 1$ est en quantité relative inférieure à la quantité relative qui le caractérise dans le sérum. Nous nous basons, comme nous l'avons dit, plus sur l'électrophorèse en gel d'amidon que sur l'immuno-électrophorèse dont on sait l'imprécision pour toute mesure quantitative. Or nous avons un point de comparaison idéal : si l'on considère le processus de filtration glomérulaire lors des atteintes de type néphrose on est frappé par la dissemblance qui existe entre les tracés électrophorétiques urinaires dans ce cas et les tracés électrophorétiques correspondant au liquide céphalorachidien.

En effet, si l'on compare ces deux sortes de tracés on s'aperçoit qu'en gel d'amidon les quantités de séromucoïde α 1 trouvées dans de telles urines sont en proportion considérablement augmentées par rapport à celles trouvées dans le sérum correspondant ce qui n'est jamais le cas dans le liquide céphalorachidien ; tous les auteurs sont d'accord sur ce sujet.

Une observation d'origine pathologique peut contribuer à éclairer légèrement ce problème. En effet, lorsqu'il y a pour une raison quelconque une gêne ou un empêchement à la libre circulation du liquide céphalorachidien entre les ventricules dans lesquels se trouvent les plexus choroïdes qui sont à la base de sa formation et les espaces sous-arachnoïdiens, on constate plusieurs phénomènes particuliers lorsqu'on analyse différenciellement les liquides situés au contact des plexus choroïdes et des liquides qui en sont pour une telle raison coupés. La production liquidienne se continue en dessous des plexus choroïdes, toutefois les tracés électrophorétiques sont notablement différents. En effet, si le tracé qui est au contact des plexus choroïdes reste à peu près identique à celui d'un liquide céphalorachidien normal à quelques différences que nous verrons plus loin, le tracé situé au-dessous des éléments de blocage s'enrichit très rapidement en séromucoïde α 1 pour arriver à des taux relatifs de séromucoïde α 1 beaucoup plus importants que ceux du sérum correspondant. Parallèlement on note un enrichissement également en γ globulines 7 S. Ce fait peut s'expliquer de deux façons : ou bien il y a production locale de séromucoïde α 1 et de γ globulines, nous verrons plus loin que cette deuxième hypothèse peut parfaitement être envisagée, ou bien il y a passage dans le liquide céphalorachidien d'éléments sériques par un processus de filtration provenant des vaisseaux qui entourent l'arachnoïde. La similitude de ces tracés avec certains tracés urinaires de néphrose peut effectivement faire penser à une telle solution. Toutefois, comme nous le verrons pour les γ globulines il est possible dans le cas de ces dernières fractions de démontrer une production locale et indépendante du sérum. Cette hypothèse peut donc rester valable pour le séromucoïde α 1. Le problème ne peut donc encore se résoudre bien qu'il permette de montrer que la filtration au niveau des plexus choroïdes est beaucoup plus complexe que celle déjà décrite. Il n'est pas par ailleurs impossible de penser qu'un séromucoïde α 1 produit normalement pourrait être réabsorbé de façon sélective plus rapide, peut-être par le fait qu'il diffère des autres protéines par sa teneur considérable en glucides, toutefois on s'expliquerait mal alors pourquoi dans les blocages on ne le trouve pas augmenté précisément dans les parties qui sont normalement en dehors des aires normales de résorption.

II LES IMMUNO-GLOBULINES

Les γ globulines du liquide céphalorachidien sont comme nous l'a -

vons vu très peu abondantes (entre 4 et 7 % environ du taux total des protéines du liquide céphalorachidien, moins de 10 % peut-on affirmer en toute certitude). Ces γ globulines de mobilité plus rapide en immuno-électrophorèse et en électrophorèse sur papier que les γ globulines sériques représentent la partie antérieure de la courbe de précipitation des γ globulines normales. Toutefois, l'accord s'est fait sur leur poids moléculaire et leur constante de sédimentation variant entre 6 et 7 S suivant les auteurs.

On ne trouve pas de γ globulines de faible poids moléculaire comme dans les urines normales. Il paraît donc logique de penser que les γ globulines sont d'origine sérique uniquement, provenant d'un simple processus de filtration.

Toutefois, il semble ici possible d'émettre une hypothèse légèrement différente : en effet, lors d'agressions strictement limitées au tissu cérébral, il y a une production in situ de γ globulines indépendante du taux des γ globulines sériques comme nous l'avons démontré dans une récente publication (1963) (61).

Cette production peut être très importante et peut même se faire dans des cas d'hypo- γ -globulinémies. On voit apparaître non seulement des quantités importantes de γ globulines normales mais également des quantités considérables de γ A globulines et même de γ M macro globulines. Il y a donc apparition en masse d'immunoglobulines. Le tissu cérébral a donc parfaitement la faculté

PLANCHE N° 22

Fig 1 :

Electrophorèse en gel d'amidon

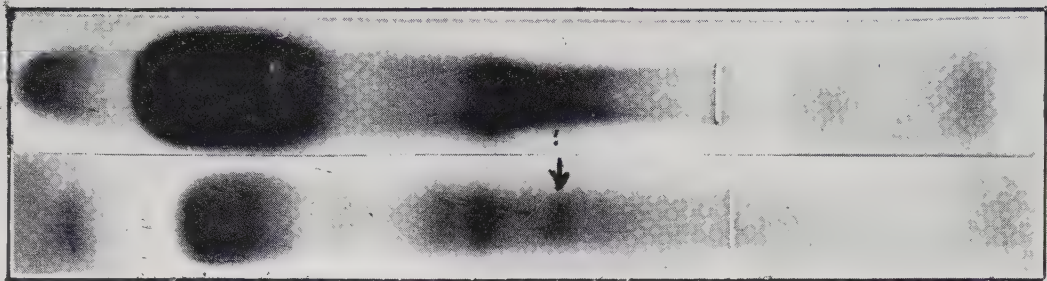
En haut : LCR d'hydroanencéphalie

En bas : LCR normal

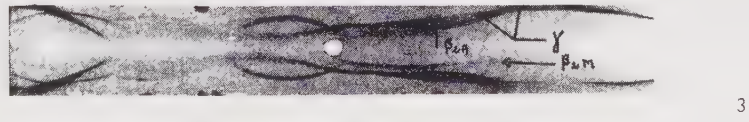
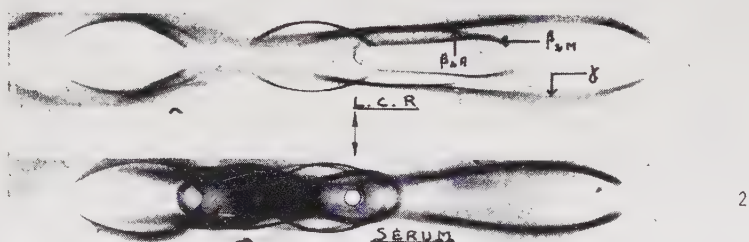
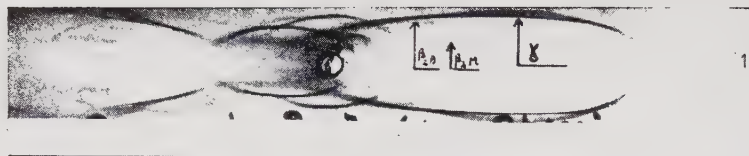
On note la quantité accrue de pré-albumine et de "post- γ " dans le LCR pathologique et la forte diminution relative de la sidérophiline propre au LCR dans le même liquide.

Fig 2 :

Liquides céphalorachidiens prélevés au cours d'abcès du cerveau. En 2, le sérum correspondant est très pauvre en γ A alors que le LCR en contient des quantités considérables.



1



2

té de produire des immunoglobulines lors d'agressions infectieuses par exemple. C'est d'ailleurs une des caractéristiques même des scléroses en plaques de voir apparaître dans le LCR des γ globulines en quantité importante, ayant vraisemblablement leur origine dans le tissu cérébral même, les autres composants restant parfaitement normaux, en quantité et en qualité. Il n'est donc pas interdit de penser que les γ globulines du liquide céphalorachidien puissent être, au moins en partie, normalement produites par le tissu cérébral. Ceci n'est évidemment pour l'instant qu'une hypothèse (planche 22).

III LA PRE-ALBUMINE

Dès le début des études électrophorétiques du liquide céphalorachidien les auteurs ont été frappés par l'importance relative de la pré-albumine. Au début d'ailleurs elle a été considérée comme propre au LCR et ce n'est que secondairement qu'on l'a mise en évidence dans le sérum. C'est dire la disproportion qui existe entre sa présence dans le LCR et dans le sérum. Cette disproportion ne peut s'expliquer par un simple processus de filtration : en effet si l'on compare le rapport pré-albumine/albumine, rapport intéressant puisque ces deux molécules sont de poids moléculaire voisin, on s'aperçoit que ce rapport est très différent d'un liquide à l'autre.

Par ailleurs si l'on compare ces faits à ce qui se produit lors de protéinuries de type sélectif (syndrome néphrotique de l'enfant par exemple) on constate que les quantités de pré-albumine trouvées sont strictement proportionnelles à celles de l'albumine ; or il s'agit là d'un indiscutable processus de filtration. Les résultats comme nous l'avons déjà vu sont très différents de ceux trouvés pour le LCR. On ne peut donc encore pas invoquer un seul processus de filtration.

Dès lors 3 hypothèses peuvent être envisagées :

- une production tissulaire d'origine cérébrale
- une production liée à la filtration : il y aurait alors sécrétion par les plexus choroïdes de cette protéine
- un processus mixte.

Fort curieusement les auteurs se sont plutôt attachés à la première hypothèse, se basant pour la plupart sur l'étude électrophorétique des protéines solubles constitutives du tissu nerveux central (BOOIJ). Mais tous les auteurs travaillant sur ce sujet entre 1960 et 1963 trouvent des bandes pré-albuminiques de mobilité toujours supérieures à celles de la pré-albumine du LCR et toujours multiples (3 à 5 lignes suivant les auteurs).

Parmi ces auteurs GERHÀRD-HAUSEN et CLAUSEN, puis VAN SANDE décrivent une pré-albumine cérébrale identique à celle du LCR mais existant en très petites quantités (62).

Par contre certains auteurs ont pu mettre en évidence dans le LCR des pré-albumines de mobilité supérieure, mais ceci toujours dans des liquides pathologiques (PERT et KUTT) (63).

LATERRE (1964) a repris ces études et il a pu conclure à la non identité entre les pré-albumines cérébrales et la pré-albumine du LCR et du sérum, tant immunologiquement qu'électrophorétiquement. Il pense que lorsque l'on trouve des pré-albumines identiques à celles du LCR dans les extraits cérébraux cela peut parfaitement provenir d'une contamination par le LCR ou d'une simple contamination sérique post-mortem. Néanmoins il pense que la fraction anodique trouvée parfois dans le LCR pourrait correspondre à une ou deux fractions de pré-albumines cérébrales.

Par Histo-immunofluorescence à partir d'un immunsérum anti-pré-albumine dans des coupes de plexus choroïde de Singe (*Cercopithecus aethiops*) LATERRE ne peut mettre en évidence aucune fluorescence lui permettant de conclure (65).

Devant ces résultats négatifs il pense à la possibilité non d'une sécrétion mais d'une concentration de la pré-albumine par les plexus choroïdes à partir de celle du sérum.

Données personnelles :

Nous avons suivi la même démarche que LATERRE sans toutefois vérifier par nous-mêmes l'existence des protéines cérébrales en position pré-albuminique. Enfin nous avons essayé à l'aide de cultures de plexus choroïdes de mettre en évidence une sécrétion de "novo" de cette protéine par ces mêmes plexus.

Nous nous appuyons ensuite sur des arguments cliniques.

a : cultures de plexus choroïdes :

La nature même des cellules épithéliales des plexus choroïdes est intéressante puisque leur structure ergatoplasique suggère une activité sécrétoire qui peut dans certains cas être intense. Or nous avons remarqué que dans les plexus choroïdes provenant d'exérèses pour la cure d'hydrocéphalie, leur activité sécrétoire semblait intense, ces résultats étant en accord avec l'augmentation de la teneur en pré-albumine des liquides céphalorachidiens correspondants.

Ces faits nous ont amenés à essayer de mettre en évidence la pré-albumine dans des cultures in vitro de ce tissu.

Malheureusement nous n'avons pu réussir une culture prolongée qu'une fois. D'autre part, notre source de plexus choroïde frais s'est tarie dès que l'indication opératoire de plexectomie a été remplacée par les mises en place de valves et dérivations artificielles.

Mais le résultat obtenu est néanmoins intéressant.

Prélèvement : les explants sont recueillis peropératoirement dans une fiole stérile de 250 ml contenant 100 ml de milieu de EAGLE (EAGLE BM 1955). Cette quantité de liquide importante dilue des globules rouges et assure une stabilité correcte de pH. Le transport est réalisé dans les 2 heures jusqu'au laboratoire sans réfrigération.

Mise en culture : Les fragments sont prélevés à la pipette dans le milieu de transport, rincés rapidement et s'il y a lieu dilacérés en petits fragments de quelques 1/10° de millimètres entre deux aiguilles. Ils sont ensuite déposés sur une lamelle sèche de 24 x 24 mm qui est recouverte à son tour d'une 2e lamelle maintenant les explants en sandwich. Les lamelles sont déposées dans le fond d'une fiole cylindroconique à large ouverture et on introduit le milieu de culture.

Celui-ci est composé de 80 % de milieu de STOKER (milieu de EAGLE avec une concentration double en acides aminés) et de 20 % de sérum de veau inactivé dont on a vérifié l'absence de toxicité pour les fibroblastes humains. Le temps difficile à réaliser est l'introduction très lente du milieu dans le flacon : il ne faut pas déplacer les lamelles car tous les explants flottant dans le milieu meurent sans se développer. L'atmosphère du flacon est remplacée par un mélange AIR/CO₂ = 95/5, le flacon est bouché avec un bouchon de vinyl puis capuchonné par une feuille d'aluminium.

La culture

Les flacons sont ensuite mis à l'étuve à 36° ; il ne faut pas y toucher avant le 3° jour au moins, les mouvements risquant de déplacer les explants. L'examen pourra par contre être fait quotidiennement à partir du 4° jour à l'aide d'un microscope inversé dont l'éclairage est dévié latéralement. Le milieu est changé au 8° jour et remplacé par un milieu contenant seulement 5 % de sérum de veau et 100 unités de pénicilline par ml.

La culture est fixée et colorée vers le 25^e jour lorsque la prolifération fibroblastique commence à étouffer l'explant de départ. Les cellules peuvent être colorées par n'importe quelle méthode classique. Dans tous les cas nous avons tenté de réaliser un passage au 15^e jour en séparant les 2 lamelles dont chacune est alors placée dans un flacon neuf de culture. Le développement ne paraît pas accéléré de façon notable, même pour les fibroblastes par cette méthode.

La culture de plexus choroïde a été tentée de cette manière sur deux prélèvements. 5 cultures ont été faites sur le premier, et 4 sur le second. Seules 3 des cultures du premier prélèvement ont donné lieu à une pousse visible. Le liquide de culture introduit le 5^o jour, retiré le 18^o jour a été prélevé pour l'analyse électrophorétique.

Les cellules ont été tuées par fixation au liquide de CARROY au 26^o jour.

Cette étude a pu être réalisée grâce au Dr P. VINCENT (Institut Pasteur de Lyon).

PLANCHE N° 23

Fig 1 :

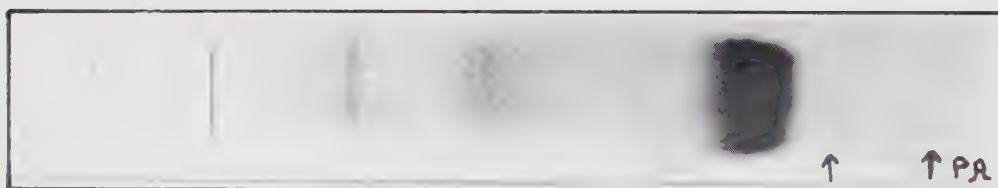
Aspect d'une culture de plexus choroïde au 18^{ème} jour. La prolifération fibroblastique est encore modérée.

Fig 2 :

Aspect en gel d'amidon du liquide de culture au 18^{ème} jour. On note une trace nette de pré-albumine, normalement absence du sérum de veau.



1



2

Résultats :

Après avoir vérifié que le sérum de veau ne contenait aucune protéine migrant dans la zone pré-albuminique nous avons étudié le liquide prélevé par gel d'amidon technique qui permet de mettre en évidence de très faibles quantités de pré-albumine.

Par ailleurs les différents lavages et changements de milieu excluaient toute possibilité de contamination sérique ou LCR.

Toutefois nous ne disposions à l'époque d'aucun immunsérum spécifique anti LCR ou anti-préalbumine ; nous n'avons donc pas pu faire de vérification immunologique.

Nous avons été surpris de constater, une seule fois malheureusement, la présence en gel d'amidon d'une ligne colorée par l'amido-schwarz dans la zone pré-albuminique indiscutable associée avec une ligne plus discutable dans la zone que nous avons appelé pré-albuminique lente correspondant au séromucoïde α 1.

La non reproductivité de ce résultat, l'absence de toute analyse immunologique, nous empêche de lui accorder une importance déterminante. Il est néanmoins assez troublant pour que nous le rapportions dans ce travail.

b : les faits cliniques

Ils peuvent ainsi se résumer :

- Le liquide d'origine ventriculaire est toujours plus riche en pré-albumine que le liquide lombaire.

- Les hydrocéphalies : elles se subdivisent en communicantes et non communicantes :

dans les premières le liquide ventriculaire communique normalement avec les espaces sous-arachnoïdiens ;

dans les deuxièmes, il y a une obstruction dans la communication soit d'un ventricule à l'autre soit des ventricules avec les espaces sous-arachnoïdiens.

Dans le premier cas les liquides ventriculaires et lombaires sont identiques aux différences physiologiques peu importantes mentionnées ci-dessus.

Dans le deuxième cas les différences entre les deux liquides sont spectaculaires.

La pré-albumine est très augmentée dans le liquide d'origine ventriculaire.

Elle a pratiquement disparu du liquide situé au-dessous du blocage.

Nous avons trouvé les mêmes résultats lors de blocages par tumeur par exemple au niveau du 4° ventricule ou même plus bas : chaque fois le liquide qui restait en communication avec les ventricules était normal, l'autre était considérablement appauvri en pré-albumine.

Enfin il existe parfois des collections liquidiennes intracérébrales, ces collections peuvent être en communication avec les ventricules donc avec les plexus choroïdes ou en être séparées. Dans le premier cas le LCR contenait une quantité normale de pré-albumine, dans le deuxième cas il en est totalement dépourvu.

Ces faits en eux-mêmes sont suffisamment significatifs. Ils sont en plein accord avec les constatations que LATERRE a faites dans un travail mené parallèlement.

Quoiqu'il en soit on peut conclure à une production de pré-albumine liée aux plexus choroïdes soit par un phénomène de concentration à partir du sérum soit par un phénomène de sécrétion véritable. Nos études par culture de tissu nous rendent partisans de la deuxième hypothèse quoique les réserves que nous avons émises à leur sujet nous incitent à la prudence.

Enfin il est à noter que les seuls endroits où l'on retrouve la pré-albumine sont les liquides oculaires. Or, il existe une formation tissulaire à la base de la production de ces liquides dont la structure est très voisine de celle des plexus choroïdiens : les procès ciliaires.

IV LES SIDEROPHILINES

Nous avons vu dans l'étude que nous avons consacrée à cette protéine qu'elle présente la particularité d'être double dans le LCR.

La première est identique à celle du sérum.

La deuxième est propre au LCR. Elle est néanmoins très voisine de la première puisqu'elle a les mêmes caractéristiques immunologiques.

C'est dire que le problème de l'origine de cette protéine s'est d'emblée posé.

Des études récentes de FRICK (1963) ont montré qu'il y avait une production locale de sidérophiline (étude du passage de la sidérophiline marquée à ^{131}I dans le LCR) (67).

ROSENTHAL et SOOTHIL (68) émettaient l'hypothèse d'une synthèse in situ de sidérophiline, seul fait leur permettant d'expliquer la quantité anormalement importante de sidérophiline dans le LCR surtout lorsque l'on sait que la sidérophiline suit étroitement l'albumine dans tout processus de filtration.

Les travaux de PARKER et BEARN (69) sur l'action de la neuraminidase sur la sidérophiline sérique firent poser une question plus précise : la deuxième sidérophiline provient-elle de l'action des neuraminidases cérébrales sur la sidérophiline d'origine sérique ?

Or PARKER notait :

1 : On ne retrouve jamais dans le LCR de ligne intermédiaire en gel d'amidon, témoin de l'action partielle de la neuraminidase.

2 : On ne peut reproduire l'action de la neuraminidase par incubation de sidérophiline par du LCR.

Il avait donc conclu à une origine tissulaire de cette deuxième sidérophiline.

LATERRE est moins affirmatif car il a pu reproduire quoique peu souvent et surtout avec des LCR pathologiques une action neuraminidasique sur la sidérophiline en incubant cette protéine avec du LCR (69).

Données personnelles :

Quelques constatations supplémentaires peuvent être faites :

1 : Nous n'avons également jamais constaté de lignes intermédiaires en gel d'amidon comme on les voit au cours de l'action de la neuraminidase.

2 : Comme PARKER les incubations de sidérophiline fraîche et préparée sans véronal sont restées inopérantes en 24 heures. Nous avons vu que la sidérophiline traitée par le véronal ou préparée à partir de résines échangeuses d'ions était très fragile et que spontanément elle donnait des images exactement superposables à celles que donnent l'action de la neuraminidase.

3 : Dans un liquide apparu hors de toute formation gliale comme le liquide sous-rétinien, on trouve une pré-albumine comparable à celle du LCR mais on ne trouve jamais de deuxième sidérophiline.

4 : Dans l'humeur vitrée, au contact de formations qui peuvent être assimilées à des formations gliales on trouve une petite quantité de cette deuxième

sidérophiline, le rapport sidérophiline "sérique" sur sidérophiline "LCR" étant très augmenté par rapport à celui du LCR.

5 : Dans un cas très intéressant que nous avons pu étudier d'hydranencéphalie nous avons trouvé un rapport sidérophiline "sérique" sur sidérophiline "LCR" comparable à celui trouvé dans l'humeur vitrée, donc très augmenté. Or chez ce jeune malade il ne restait presque plus que des plexus choroïdes énormes flottant au milieu d'une cavité remplie d'un LCR riche en pré-albumine : le rapport matière cérébrale/liquide était considérablement diminué.

La deuxième sidérophiline semblait donc être dépendante de la présence de tissu cérébral.

6 : Par contre notre étude dans le règne animal nous a montré que chez les mammifères étudiés le seul dont la sidérophiline ne réagissait que peu à la neuraminidase était précisément celui où l'on ne trouvait dans le LCR pratiquement aucune modification par rapport au sérum correspondant (Babouin).

Le Chien qui présente des sidérophilines très spécifiques dans son LCR possède une sidérophiline sur laquelle l'action de la neuraminidase reproduit exactement les particularités rencontrées dans son LCR.

7 : Certains tissus sont capables de synthétiser des protéines fixant le fer (lactotransferrine du lait, transferrines des sécrétions bronchiques) et différentes de la sidérophiline sérique.

Ces faits nous amènent à formuler l'hypothèse suivante :

Il est possible d'envisager une production in situ de sidérophiline, comme il existe une production locale d'immunoglobulines. Toutefois les teneurs importantes en neuraminidase du tissu cérébral lui interdisent-elle toute fixation d'acide sialique en cours de synthèse. Ceci est peut-être à rapprocher du fait que les "post- γ " du LCR ne sont pas "PAS positives".

Nos résultats sur le Chien vont toutefois nous permettre de rechercher l'origine de cette sidérophiline sur des coupes de cerveau puisqu'il semble se conduire pour ce problème de la même façon que l'homme.

Le problème posé par la sidérophiline de Carpe est différent et nous sommes encore incapables d'en donner une explication.

V : LES "POST- γ " GLOBULINES

Un travail très important a été réalisé par LATERRE et HEREMANS, puis par LATERRE dans sa thèse sur ce sujet (70). Le fait même qu'ils appellent

cette protéine (et les autres qu'ils décrivent) "protéines tissulaires" montre déjà quel est leur avis quant à l'origine de cette fraction.

Ces auteurs se basent sur le fait qu'un immunsérum anti-LCR révèle dans d'autres liquides ou milieux biologiques des fractions révélées également dans des extraits tissulaires cérébraux et rénaux. Ils pouvaient donc émettre valablement l'hypothèse d'une origine locale. De plus, si elles n'étaient pas d'origine locale, elles devraient diffuser dans tout l'organisme et on devrait les retrouver dans le sérum sanguin. LATERRE a essayé, en concentrant 10 fois du sérum sanguin, de retrouver ces protéines, il n'y est pas arrivé. Nous-mêmes, nous avons essayé de les mettre en évidence à des concentrations bien supérieures comme nous l'avons exposé plus haut. Nous n'avons jamais pu trouver de fraction qui soit éluee après la fraction albuminique, sur gel filtration en Séphadex G 200, fractions dans lesquelles auraient dû normalement se trouver ces "post- γ " globulines. Nous avons néanmoins concentré très fortement ces fractions, et nous n'avons jamais pu trouver aucune trace protéique à l'intérieur.

Ceci est en contradiction avec les travaux d'HORCHWALD et THORBECKE qui en 1962 l'ont décrite dans le sérum. Mais ces résultats sont en accord avec les travaux de DENCKER qui lui non plus n'a jamais pu mettre en évidence de "post- γ " dans le sérum, comme d'ailleurs dans les urines pathologiques. HOCHWALD et THORBECKE, simplement, ont cru pouvoir, chez le Singe, localiser la synthèse de la "post- γ " globuline dans la moelle osseuse. Ce problème est donc loin d'être résolu (71).

Données personnelles :

Toutefois certains faits cliniques peuvent être rapportés. L'apparition de "post- γ " globulines en quantité très importante dans les urines rend compte de réactions tubulaires intenses, soit d'origine dégénérative, soit par lyse, soit par intensification de la sécrétion normale. Histologiquement, il est très difficile, tout au moins au début, de faire la différence entre une cellule en phase hypersécrétoire, ou une cellule en début de lyse. Quoiqu'il en soit, il semble que l'on trouve des "post- γ " globulines dans les 2 processus. Elles auraient donc bien une origine cellulaire locale, car il est impossible d'expliquer sa présence par une concentration à partir du plasma. Par contre dans le liquide céphalorachidien, il est plus difficile de lier sa présence ou son absence à un processus pathologique quelconque. Nous ne sommes pas encore en mesure de donner des éléments précis à ce sujet, ceci fait l'objet d'ailleurs d'une étude qui est en cours.

A côté de ces faits cliniques, un fait important est apparu. En effet, la composition en acides aminés des "post- γ " globulines d'origine urinaire, nous révèle

une composition très proche de celle du pro-collagène par les quantités importantes d'hydroxyproline et la présence d'hydroxylysine. Il faut rappeler à ce propos les travaux de LEROY et Coll. (72) qui, en 1964, mettaient en évidence dans le sérum une protéine de poids moléculaire élevée contenant de l'hydroxyproline. Ces travaux furent confirmés par ceux, très récents, de FREY (1965) (73) qui a pu montrer la parenté immunologique entre la protéine décrite par LEROY et le collagène soluble humain. Ainsi, cette protéine pourrait être soit un fragment de dégradation du collagène soit un élément précurseur. Ces 2 hypothèses peuvent parfaitement être discutées dans le cadre d'une "post- γ " globuline urinaire. Toutefois nous avons noté que cette protéine est rencontrée dans les tubulopathies congénitales de l'enfant où il n'y a pas atteinte du parenchyme rénal et où il semble que seule une sécrétion tubulaire soit en cause. De plus nous avons établi l'analogie entre cette "post- γ " d'origine tubulaire et la "post- γ " que nous avons isolée du liquide céphalorachidien. Or, il n'y a pas à proprement parler de tissu conjonctif à collagène dans le tissu nerveux central, exception faite des membranes méningées et des parois vasculaires.

Les quantités importantes de "post- γ " globulines que le LCR contient, obligent à envisager une autre origine, d'autant que LATERRE (74) trouve que des broyats de substances cérébrales sont capables de faire apparaître des anticorps anti-post γ chez l'animal immunisé.

S'agit-il d'une sécrétion d'origine gliale ? Y aurait-il un rapport entre cette sécrétion et les cellules de l'humeur vitrée ?

Nous n'avons jamais trouvé cette protéine dans les liquides sous-rétiniens qui sont pourtant en contact direct avec les formations vasculaires, ni dans aucuns liquides de kystes intra-cérébraux ou de collections liquidiennes sous-durales qui sont également en contact avec des éléments contenant de grosses quantités de collagène. Nous sommes donc dans l'impossibilité d'émettre une hypothèse valable.

Pour déterminer l'origine de ces protéines, une grosse difficulté réside en effet dans l'impossibilité dans laquelle on est, la plupart du temps, de faire des expériences chez l'Homme et surtout chez l'Homme normal.

Cela n'a pour l'instant été fait que chez le Chimpanzé qui est très proche de l'Homme sur le plan protéique. Nous avons nous-mêmes trouvé également cette "post- γ " globuline chez le Singe Babouin. Malheureusement ces animaux ne sont pas des animaux de laboratoire courants, ne serait-ce que par leur prix et les difficultés de leur entretien et de leur élevage. Malheureusement, nous n'avons jamais trouvé aucune fraction qui puisse rappeler ces fractions-là chez le Chien par exemple.

Il faudra toutefois essayer par la fabrication d'immunsérums anti-LCR

de Chiens, s'il est possible de voir apparaître dans ce LCR des protéines également d'origine tissulaire. Toutefois, les quantités de LCR dont on peut disposer chez le Chien sont relativement limitées.

VI CONCLUSIONS

Il se dégage de cette étude sur l'origine des protéines du liquide céphalo-rachidien, quelques faits fondamentaux :

1°) La plupart des protéines du liquide céphalorachidien tirent leur origine du sérum sanguin.

2°) Toutefois, certaines anomalies dans les quantités relatives de ces protéines peuvent se faire poser la question d'une filtration sélective ou d'une réabsorption sélective.

3°) Certaines de ces protéines semblent tirer leur origine du tissu cérébral même : deuxième sidérophiline par exemple.

4°) D'autres protéines n'ont aucun point commun avec les protéines sériques et tirent vraisemblablement leur origine directement du tissu cérébral : c'est le cas des protéines que LATERRE a appelées protéines tissulaires, et dans le cadre desquelles rentre notre "post- γ " globuline ; la parenté de cette protéine avec le pro-collagène est toutefois difficile à expliquer.

5°) Enfin il y a la possibilité d'une production à partir du tissu cérébral de protéines semblables aux protéines sériques : c'est le cas des γ globulines.

CONCLUSIONS

Ce travail nous a permis d'apporter à la connaissance des protéines du liquide céphalorachidien humain des éléments dont certains complètent ou confirment des études faites ou en cours et dont certains sont entièrement originaux.

Sur le plan des techniques :

Nous définissons un protocole de concentration qui nous semble à la fois sûr, rapide et non dénaturant tout en permettant des concentrations très élevées.

Nous présentons une technique d'immuno-électrophorèse simple, facile à mettre en oeuvre et permettant la comparaison de divers liquides biologiques les uns par rapport aux autres.

Nous proposons une méthode non dénaturante de préparation de fractions protéiques, méthode ne nécessitant que des moyens limités.

Sur le plan des résultats :

Nous apportons notre contribution à la définition des diverses fractions protéiques du LCR en électrophorèse sur papier, en immuno-électrophorèse.

Nous faisons une étude systématique par électrophorèse en gel d'amidon de ces protéines.

Nous étudions le LCR par gel filtration sur Séphadex G 200 et nous proposons à partir de cette étude une méthode de préparation de diverses fractions protéiques.

Nous avons isolé la pré-albumine et les "post- γ " globulines du liquide

céphalorachidien, nous avons pu les étudier sur le plan analytique.

Nous avons comparé l'action de la neuraminidase sur la sidérophiline humaine et sur la sidérophiline du Singe Babouin, du Chien et de la Carpe.

Nous avons comparé les résultats obtenus avec ceux que l'on trouve dans d'autres liquides biologiques : liquides oculaires, liquides céphalorachidiens, urines.

Nos résultats peuvent ainsi se résumer :

Contrairement à ce que pensaient les premiers auteurs le liquide céphalorachidien est composé de protéines qui lui sont propres en partie. On ne peut donc plus invoquer un seul processus de filtration pour sa formation.

Ses caractéristiques essentielles par rapport au sérum sanguin sont :

- présence d'une quantité importante de pré-albumine riche en tryptophanne
- présence d'une deuxième sidérophiline
- présence de protéines de faible poids moléculaire qui ne semblent pas exister dans le sérum
- absence de la plupart des macroprotéines sériques exception faite des α 2 M globulines.
- très forte diminution du taux des immunoglobulines.

L'isolement de la pré-albumine et son étude nous ont montré des différences sensibles quant à ses constantes physico-chimiques avec les résultats d'autres auteurs : taux plus élevé de tryptophanne, constante de sédimentation plus élevée, légères différences dans la composition en aminoacides.

L'étude des sidérophilines nous a montré un processus de dénaturation voisin de l'action de la neuraminidase, tout au moins en tampon véronal.

L'étude des "post- γ " nous a montré une protéine riche en hydroxyproline et hydroxylysine. Nous ne nous sommes pas expliqué ce fait.

L'étude des liquides biologiques tels que liquides oculaires, urines nous a montré des parentés parfois importantes :

L'humeur vitrée a une composition protéique pratiquement superposable à celle du LCR.

Les urines de tubulopathies sont très riches en une "post- γ " identique à celle du LCR.

La comparaison des sidérophilines du LCR humain avec celles d'autres mammifères montre des modifications du même ordre ce qui permettra par une expérimentation chez l'animal d'étudier le problème de l'origine des sidérophilines du LCR.

Enfin l'origine des protéines du LCR a été évoquée :

Origine locale probable pour les immunoglobulines, pour les "post- γ " globulines.

Origine dans les plexus choroïdes de la pré-albumine.

Mais de nombreux points restent encore à éclaircir :

- préciser la nature exacte de la pré-albumine
- préciser la nature exacte de la deuxième sidérophiline du LCR
- compléter l'étude des "post- γ " globulines, isoler et étudier les autres microglobulines du LCR.
- élucider le rôle et l'origine de ces microglobulines.
- étudier chez l'animal les lieux d'origine de ces différentes protéines.

TRAVAIL réalisé grâce :

au CENTRE NATIONALE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (Directeur de Recherches : Professeur L. PAUFIQUE)
et à l'INSTITUT PASTEUR de LYON (Professeur P. CROIZAT Directeur)

Je remercie Monsieur le Docteur R. CREYSEL qui a mis à ma disposition son Laboratoire (Service de Biochimie Clinique Hôpital Edouard Herriot LYON).

BIBLIOGRAPHIE

AVERTISSEMENT :

Cette bibliographie n'est pas complète.

Elle a été volontairement limitée aux références portant sur les protéines du I.C.R. normal.

Seules les publications effectivement lues ou analysées ont été retenues.

Les chiffres entre parenthèses correspondent à l'ordre de citation dans le texte de la référence qu'ils accompagnent.

Ils peuvent être communs dans le texte à un groupe de références citées à propos d'un même sujet.

- ALAJOUANINE Th, FOURNIER Et, GERVAIS P : Dysprotéinorachies. Les réactions des béta lipoprotéines dans le liquide céphalorachidien : Presse Med. 1960, 11 385
- ALY F W : Untersuchungen über die elektrophoretische isolierte Vorfraktion aus Liquor cerebrospinalis. Biochem Z. 1954, 325, 505 (37)
- ALY F W : Zur Frage der Identität des praalbumin im serum und der Vorfraktion im Liquor, in Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für innere Medizin, Kongress 1957, 689, Bergman München (37, 40)
- ALY F W, SXHAYPP H: Eine quantitative bestimmung des tryptophareichen serum praalbumin im agar agar in H Peeters (Ed) Protides of biological fluids, Proceeding of the 6th Colloquium, Bruges 1958, Elsevier, Amsterdam, 1959, 158 (37)
- BAILEY B F S, HEALD P J : Quantitative estimation of proteins in extracts of cerebral tissues after separation by electrophoresis in starch gel : J. Neurochem 1961 7 81
- RAMMER H : Demonstration of beta 1 C globulin in LCR normal : Klin. Wschr. 1963 41 1084 (27)
- BAUDOUIN A, LEWIN J, HILLION P : Electrophorèse sur papier du LCR. Etude des glycoprotéines : C R Soc Biol. (Paris) 1954 148 1033
- BAUDOUIN A, LEWIN J, HILLION P : Electrophorèse sur papier du liquide céphalorachidien. Etude des lipoprotéines C R Soc Biol. : 1953, 147, 1036 (16)
- BAUDOUIN A, LEWIN, J HILLION P : Les lipoprotéines du liquide céphalorachidien; composante lipoprotéinique de la fraction X rapide, protéine rapide du plasma : C R SOC. Biol. 1955 149 1093
- BAUER H : Cerebrospinal fluid. Report on a Symposium, Hamburg June 30-July 2 1960 Wld Neurol. 1961 2 254
- BEARN A G, PARKER W C : Some observations on transferrin : in Iron Metabolism, International Symposium Ciba : 1964. (32, 44, 69)
- BEAVER G H, HOLIDAYER Ultraviolet absorption spectra of proteins and amino acids Advanc. in Prot. Chem. 1952 7 319
- BELANGER C, LAROCHE F, POUDRIER C, Soeur de Lorraine MARTIN : Etude sur le liquide céphalorachidien par l'électrophorèse sur papier : méthodes et valeurs normales : Laval Med. 1958 26 4 622.
- BELANGER C, Sr J de Lorraine MARTIN : Etude sur le liquide céphalorachidien par électrophorèse sur papier Laval Med. 1962 33 797.
- BERGGARD I : Identification and isolation of urinary proteins H Peeters (Ed) Protides of the Biological Fluids, Scientific program of the XII colloquium Bruges 1964 27 (50)
- BERGGARD I : On the fractionation of proteins, glycoproteins and mucopolysaccharides in normal human urine by zone electrophoresis Acta Soc. Med. Upsal. 1959 64 156. (50)
- BERGGARD I : Studies on the plasma proteins in normal human urine Clin Chim Acta 1961 6 413 (21, 50)
- BERGGARD I : On a gamma globulin of low-molecular weight in normal human plasma and urine Clin Chim Acta 1961, 6, 545 (50)
- BERGGARD I : Proteins, Glycoproteins and mucopolysaccharides in normal human urine : I fractionation of non dialysable materials by ultrafiltration and by zone electrophoresis : Ark. Kemi, Sverige : 1962 18 241 (21, 50)
- BERGGARD I, BEARN A G Excretion of haemoglobin in normal urine : Nature (London) 1962 195 1311 (50)
- BERGGARD I, RISINGER C I : Quantitative immunochemical determination of albumin in normal human

- urine : Act. Med. Soc. Upsal : 1961 8 217
- BISERTE G, BRETON A, HAVEZ R : Etude électrophorétique et immunoélectrophorétique des protéines urinaires chez l'enfant sain et au cours des néphropathies : Arch. Franç. Pediat. 1958 16 634
- BISERTE G, HAVEZ R, LATURAZE J : Caractérisation électrophorétique et immunologique du séromucoïde bêta dans le sérum sanguin : C R Soc. 1960 f54 2061
- BLAU J N, HARRIS H, ROBSON E B : Haptoglobins in cerebrospinal fluid : Clin. Chim. Acta 1963 8 202 (23)
- BOCCI V : Starch Pevikon C-870 gel as supporting medium in zone electrophoresis : J; Chromat. 1963
- BOFFA G. A, FINE J. M : Revue France Etudes CLIN et BIOL. 1962 7 813 (7)
- BOOIJ J. The origin of the pre-albumin in the cerebrospinal fluid Folia Psychiat. neerl 1958 61 20 (62)
- BOTTIGER I, Norberg R : Zone electrophoresis in polyvinyl chloride, methodological studies : Clin. Chim Acta 1964 9 82.
- BOWSER D R : A possible mechanism of hydrocephalus : the osmotic regulation of cerebrospinal fluid volume in CE W W olstenholme and C M O' Connor (Ed), Ciba foundation Symposium on the cerebrospinal fluid, Churchill London 1958 282.
- BRACKE BRIDGE C J : Cerebrospinal fluid proteins fractions in health and diseases : J. Clin. Path. 1962 15 3 206.
- BRONNISTAM R, DENCKER J, SWAHN B; fibrinogen in CSF, Fibrinogen demonstrated by micro-immuno-electrophoresis Arch Neurol (Chicago) 1961 4 3 288
- BRUNELLI M A, MAZZONI A : Recherches préliminaires sur la composition du LCR (composition protéique) et immunoélectrophorèse sur acétate de gélose : Arch. di Path. e Clin. Med. 1961 39 2 107.
- BURTIN P : les protéines du liquide céphalorachidien in Grabar Analyse immunoélectrophorétique Masson et Cie (Paris) 1960 245 (24, 28)
- BURTIN P : Etude sur les protéines du liquide céphalorachidien : Clin. Chim. Acta : 1959 4 72 (26, 45)
- BUTLER E A, FLYNN F V The occurrence of post-gamma protein in urine a new protein abnormality J. Clin. Path. 1961 14 172
- BUTLER E A, FLYNN F V, The proteins of renal tubular disorders : Lancet 1958 2 978
- BUTLER E A, FLYNN F V, HARRIS H, ROBSON E B : A study of urine proteins by two-dimensional electrophoresis with special reference to the proteinuria of renal tubular disorders : Clin. Chim. Acta : 1962 7 34.
- CAGIANUT B, WUNDERLY C : Etude des protéines du vitré humain Brit. J. Opht. 1953 3 228
- CAMERON G.: Secretory activity of choroïd plexus in tissue culture : Anat. Rec. 1953 117 115
- CAMPANINI T, MISSERE G, TONINIG: Substance PAS positive du liquide céphalorachidien; recherche électrophorétique Riv. Spir. di Feniati. 1960
- CHATAGNON C, CHATAGNON P : Etudes des protéines cérébrales solubles de l'humain :
 I Etude par électrophorèse sur papier
 II Recherches chimiques et immunologiques
 III Fractionnement par voie chimique : caractérisation des protéines isolées.
 IV Electrophorèse en gélose et immunoélectrophorèse Ann. Biol. Clin. 1960 7 9 1 (62)
- CHARLWOOD P A : Ultracentrifugal characteristics of human, monkey and rat transferrins Biochem. J. 1963

- CIER J F, MANUEL Y, LACOUR J R : Etude électrophorétique des protéines de la sueur humaine : C R Soc Biol. 1963 157 1623 (54)
- CLAUSEN J : The serum protéins in normal and pathological spinal fluids : Acta Psychiat. Scand. 1960 35 11 (24, 27, 28)
- CLAUSEN J : Immuelectrophoretic investigations of normal and pathological cerebrospinal fluids; their correlations with findings in human serum : Wld Neurol. 1960 1 479.
- CLAUSEN J : Proteins in normal cerebrospinal fluid not found in serum : Proc. Soc. exp. Biol; 1961 107 170
- CLAUSEN J, MUNKNER T : Transferrin in normal cerebrospinal fluid : Nature 1961 189 60 (26, 45)
- CLAUSEN J, KROCSGAARD A, QJAADE F ; C-reactive protein in cerebrospinal fluid : Dan. Med. Bull. 1962 9 14.
- CLAUSEN J, KROGSAARD A, QUADE F : Immuno-electrophoretic studies of the cerebrospinal fluid and serum in acute, mainly infectious diseases of the central nervous system : J. Infect. Dis. 1962 3 128
- CLAUSEN J : Some recent methods for fractionation of proteins employed in diagnostic examination of CFS Dan. Med. Bull. 1962 9 11
- COLOVER J : A microtechnique for proteins concentration suitable for quantitative electrophoresis of CFS J. Clin. Path. 1961 14 5 559.
- COOPER W J : Immunochemical analysis of vitreous body and subretinal fluid : Invest. Ophth. 1963 2-4 369
- CORNILLOT P, BOURILLON R, MICHON J, GOT R : Isolement et caractérisation des gamma globulines urinaires : Biochim. Biophys. Acta : 1963 71 86
- CREYSEL R, FINE J M : Quelques schémas de correlations des données fournies par diverses techniques d'étude des protéines sériques ; Transfusion 1959 2 127
- CREYSEL R, RICHARD G, MANUEL Y, SILBERZHAN P, BETUEL H : Etude immunoélectrophorétique du sérum de Carpe (Cyprinus Carpio) in H. Peeters (Ed). Protides of the Biological fluids 12 th Colloquium Bruges 1964 161.
- CREYSEL R, SILBERZHAN P, RICHARD G, MANUEL Y : Etude du sérum de carpe (Cyprinus Carpio) par électrophorèse en gel d'amidon Bull. Soc. Chim. Biol. 1964 46 149.
- DAVSON H : Physiology of the ocular and cerebrospinal fluids Churchill London 1957 (2)
- DECHAUME J, MANUEL Y, BOURRAT Ch, CREYSEL R, ROBERT J M : Electrophorèse des protéines du LCR au cours d'affections neurologiques : J; Med. Lyon 1962 43 1008 589 (66)
- DENCKER S J, GOTTFRIES I, SWAHN B : Paper electrophoretic investigation of protein-bound lipids in CSF. A preliminary report : Acta Med. Scand. 1959 165 2 157
- DENCKER S J, SWAHN B : Clinical value of protein analysis in CSF : a micro-immuno-electrophoretic study Lunds Univ. Arsskrift. 1961 57 101
- DENCKER S J, SWAHN B : Identification of separate proteins in CSF with the aid of micro-electrophoresis : Acta Psychiat. Scand. Suppl. 1961 150 36 319 (25)
- DENCKER S J, SWAHN B : The diagnostic value of lipoprotein, determination in CSF : Acta Psychiat. Scand. 1961 36 2 325. (16)
- DENCKER S J, SWAHN B : Proteins of central nervous origin present in CSF : Nature (London) 1962 194 4825 288

- DENCKER S J, BRONNESTAM R, SWAHN B : Demonstration of large blood proteins in cerebrospinal fluid : *neurology* 1961 11 441
- DENCKER S J, : variation of total cerebrospinal fluid proteins and cells with sex and age : *WldNeurol.* 1962 3 780
- DENCKER S J : Studies on a specific cerebrospinal gamma globulin components *Acta Neurol. Scand.* 1963 39 317. (71)
- DE RISIO C, INESI G, TONINI G : Sul signigicato delle betaglobuline nel liquido cerebrospinal umano : *Boll . Soc. Ital. Biol. Sper.* 1956 32 10-11 1280
- DE RISIO C, INESI G, TONINI G . Studies of the proteins of human CSF by paper electrophoresis : *Confin. Neurol. (Basel)* 1957 17 5 271
- DESPIEDS R, CARTOUZOU G, GIGNOUX D, CALEM M : Electrophorèse comparées sur papier acétate de cellulose et gélose, des protéines solubles du tissu cérébral humain *C R Soc. Biol. (Paris)* 1961 155 2 316.
- DESPIEDS R, LISITSKY S, CARTOUZOU G, GIGNOUX D : Immuno-électrophorèse des protéines solubles du cerveau humain *C R Soc. Biol. (Paris)* 1961 155 2 320
- DHERS, GALLOIS, MANUEL, METAIS , CREYSEL : Encéphalopathie et macroglobulinorachie au cours d'une évolution d'une maladie de Waldenström : *Lyon Med.* 1961 43 825
- DIAMENT A J : Formation, absorption et circulation du liquide de céphalorachidien. Résultats des études faites avec les isotopes radioactifs *Arch. Neuropsychiat* : 1959 17 3
- DORELLO U : Etudes électrophorétiques sur le contenu en protéines du liquide sous-rétinien dans le décollement de rétine idopathique : *Arch. di Ott.* 1955 1 417
- DUBLER H, SCHEIDEGGER JJ : Recherches immunoélectrophorétiques dans l'humeur aqueuse : *Opht.* 1958 135 5-6 640
- EDERLE W : Uber quantitative Eiweissbeztimmung in liquor cerebrospinalis ; *Dtsch. Med. Wschr.* 1949 74 1411
- ESSER H, HEINZLER F, PAU H : Séparation électrophorétique des fractions albuminiques dans l'humeur aqueuse de l'homme *Arch. pour l'Opht. et la thérapie de l'oeil* 1954 155 11
- ESSER H, HEINZLER F : method of concentration of proteins from CSF and other dilute solutions by filtration under pression with a wiew to electrophoresis on paper *Klin. Wschr.* 1952 30 25-26 600
- ESSER H, HEINZLER F : Elektrophoretische Eiweissanalysem im liquor cerebrospinalis : *Dtsch. Med. Wschr.* 1949 74 1411
- FALT G : Les protéinuries des tubulopathies congénitales : Etude électrophorétique (immunoélectrophorèse électrophorèse en gel d'amidon et électrophorèse bidimensionnelle indirecte papier-gel d'amidon) Thèse Lyon Centre Reg. Doc. Pedag. Lyon Imp 1963 (52)
- FAYET M T : Immunoélectrophorèse de l'humeur vitrée : *Bull, Soc. Chim. Biol.* 1959 41 9-189
- FINE J M, LOEB J : Electrophorèse en gel d'amidon. II Protéines et lipoprotéines du sérum humain : *Rev. Hémato* 1958 195 13(4) 449 (9)
- FINE J M, LOEB J, WASZENKO Z : High resolution of human plasma components by starch gel electrophoresis *Nature* 1958 182 452 (9)
- FINE J M ; MOURAY H ; MORETTI J : Influence de la composition des tampons sur la séparation des protéines en électrophorèse sur gel d'amidon : *Clin. Acta* 1962 7 346 (9)
- FISK A A, CHANUTIN A, KLINGMAN W O : Observations on a rapidly migrating electrophoretic components

- of CSF Proc Soc. exp. Biol. (N-Y) 1951 78 I 1 (37)
- FLODIN, KILLANDER : Fractionation of human serum by gel filtration : Biochim. Biophys. Acta : 1962 63 402 10
- FORESTIER R : Contribution à l'étude des protéines de la sueur : Thèse de Médecine Lyon 1964 (54)
- FRANCOIS J, RABAEY M, EVENS L : Agar microelectrophoresis of the aqueous humor : Arch. of Opt. 1958 59 692
- FREY C : Communication personnelle (73)
- FRICK E : Immunologische Untersuchungen zur Identifizierung einzelner Liquoreiweisskörper Klin. Wschr. 1960 22 1135 (14, 25, 40)
- FRICK E : Immuno-electrophoretische Untersuchungen zur Spezifität der Liquoreiweisskörper : Klin, Wschr. 1962 3 40 152 (30)
- FRICK E : Untersuchungen über die proteingebundenen Kohlenhydrate und lipide des liquor cerebrospinalis : Dtsch Z Nervenheilk 1962 184 53
- FRICK E, SCHEID-SEYDEL L : Immunologische Untersuchungen an Liquoreiweisskörper : Z. ges. exp. Med. 1957 3 129 221
- FRICK E, SCHEID-SEYDEL L : Untersuchungen mit ¹³¹J-Markiertem beta globulin zur Frage der Abstammung der Liquoreiweisskörper Klin. Wschr. 1960 24 38 1240 (68)
- FRICK E, SCHEID-SEYDEL L : Untersuchungen mit ¹³¹J-markiertem transferrin zur Frage der Abstammung der Liquorei weisskörper : Klin. Wschr. 1963 12 41 589 (67)
- FRICK E, SCHEID-SEYDEL L : Untersuchungen mit J-markiertem gamma-globulin zur Frage der Abstammung der Liquoreiweisskörper : Klin. Wschr. 1958 36 857 (58)
- FRICK E : Immunophoretische Untersuchungen am liquor cerebrospinalis : Klin. Wschr. 1959 37 645
- FRICK E : Quantitative bestimmung des Transferrins im normalem und pathologischen Liquor cerebrospinalis Klin. Wschr. 1963 41 75
- GALLI A, JEANMAIRE J, GERARD G : Etude électrophorétique des protéines du liquide céphalorachidien humain à l'aide d'un sérum anti-liquide céphalorachidien : Ann. Biol. Clin 1962 20 956 (30)
- GERHARDT HANSEN W, CLAUSEN J : Electrophoresis and immuno-electrophoresis of extractable proteins in brain tissue. Dan. med. Bull. 1962 9 9 (62)
- GITLIN D : Pathogenesis and subdral collections of fluid : Pediatrics 1955 16 345
- GOLSTEIN P, HILL N C , MacKENSIE B F, MacGuckin W F, SVIEN H : Identification and quantification of proteins, glyco proteins and lipoproteins of cerebrospinal fluid . Med. Clin. N. Amer. 1960 44 1053
- GOODMAN M, VULPE M A : A quantitative immunochemical method for determining serum and cerebrospinal fluid proteins Wld. Neurol. 1961 2 589 (19, 24)
- GOT R, BOURILLON R : Nouvelle méthode de préparation de la pré-albumine sérique et principales caractéristiques physico-chimiques : Experientia 1963 19 48 (41, 43)
- GRABAR P, BURTIN P : Etude immuno-chimique de la sidérophiline : Bull. Soc. Chim. Biol. 1955 37 797
- GRAVILESCO K, COURCON J, HILLION P, URIEL J, LEWIN J, GRABAR P : Etude du LCR humain normal par la méthode immunoélectrophorétique : Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris) 1955 78 37 803

- GROULADE J, GROSLAMBERT P : Contrôle des protéines de l'urine et du L. C. R. : Ann. Biol. Clin. 1960 18 (4)
- GROULADE J : Electrophorèse sur papier Allier (Imp) Grenoble 1961 (6)
- GROULADE J, OLLIVIER C : Electrophorèse homogène en gel d'amidon suivie de plastification ; Ann. Biol. Clin. 1960, 18, 595 (10)
- HABECK C : Zur Verminderung des Gesamteiweiss-gehaltes im Liquor cerebrospinalis (unter besonderer Berücksichtigung der electrophoretischen Vorfraktion) : Arch. Psychiat. Nervenkr. 202 354
- HABECK C : Die papieralektrophorese der Eiweisskörper des Liquor cerebrospinalis : Psychiat. et Neurol. (Basel) 1960 4 139 185.
- HACK M H, HELMY F M : Composition en lipides du liquide céphalo-rachidien : Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 1962 62 3 421.
- HARDWICKE J, SQUIRE J E : The relationship between plasma albumin concentration and protein excretion in patients with proteinuria : Clin. Sci. 1955 14 309
- HARDWICKE J, SOOTHILL J F : Glomerular damage in term of "pore size" in renal Biopsy : a Ciba Foundation Symposium, Wolstenholme C E and Cameron M (Ed) Boston Little Brown et C (32).
- HAUSER H M, MacKENSIE B F, MacGUCKIN W F, GOLSTEIN N P; a study of cerebrospinal protein and polysaccharide in the dog Proc. Mayo Clin. 1962 15 37 283.
- HAVEZ R, BISERTE G : Le tampon "borate" en électrophorèse de zone Clin. Chim. Acta : 1959 4 334
- HEIMBURGER N, HEIDEH, HAUPT K, SCHULTZE H E : Bausteinanalysen von humanserumprotein : Clin. Chim. Acta 1964 10 293 (17, 21, 39, 43, 50)
- HELM Van der H, ZONDAG H A, KLEIN F : On the source of lactic dehydrogenase in cerebrospinal fluid ; Clin Chim. Acta : 1963 8 193
- HEREMANS J F : Les globulines sériques du système γ : Leur nature et leur pathologie Arscia Bruxelles Masson Paris 1960.
- HESS, ROLDE E : Fluorometric essay of sialic acid in brain gangliosides : The J. of Biol. Chem. 1964 10 239
- HILL N C, MacKENSIE B F, MacKCUKIN W F, GOLSTEIN N P, SVIEN H J : Cerebrospinal fluid proteins, glycoproteins and lipoproteins in obstructive lesions of the central nervous system : Brain : 1959 82 581
- HILL N C, MacKENSIE B F, MacGUCKIN W F, SVIEN H J : Proteins glycoproteins and lipoproteins in the serum and cerebrospinal fluid of healthy subjects Proc. Mayo Clin. 1958 32 686
- HIRSCHFELD J : Immuno-electrophoretic demonstration of qualitative différences in human sera and their relation to the haptoglobins : Acta Path. Microbiol. Scand. 1959 47 160
- HIRSCHFELD J . The use of immuno-electrophoresis in the analysis of normal sera and in studies in the inheritance of certain serum proteins Science Tools : the L. K. B. instrument J, 1961 8 17 (12)
- HOCH, H et CHANUTIN, A : Electrophoretic studies on fast moving components of human Serum : J. Biol. Chem. 1953 200 241 (38)
- HOCHWALD G M, THORBECKE G J : Use of an antiserum against cerebrospinal fluid in demonstration of trace proteins in biological fluids : Proc. Soc. exp. Biol. : 1962 109 91 (48, 71)
- HOCHWALD J M, THORRECKE G J : Autoradiography of immuno-electrophoresis in the studies of sites of synthesis of trace proteins in biological fluids in H. Peeters (Ed), Protides of the Biological Fluids, Proceedings of the 10th Colloquium, Bruges 1962, Elsevier Amsterdam 1963 316 (71)

- HOCHWALD J M, THORBECKE G J : Trace proteins in cerebrospinal fluid and other biological fluids
 I Effect of various fractionation procedures on trace and trace proteins and methods for isolation of both proteins
 II Effect of storage and enzymes on the electrophoretic mobility of γ trace and β trace in cerebrospinal fluid :
 I Arch. Biochem. 1963 101 325
 II Clin. Chim. Acta 1963 8 678 (29, 33, 71)
- ISHIBASHI : Etude de la dynamique des liquides céphalorachidiens par les isotopes radioactifs : Tohoku J. exp. Med. 1959 1 70 49
- JANTZ H, WENZKE U : Können die heutigen Methoden der Eiweissbestimmung im liquor cerebrospinal befriedigen : Fortschr. Neurol. Psychiat. 1962 130 80
- JENSEN K : Ceruloplasmin in human cerebrospinal fluid : Acta neurol. Scand. 1963 39 237 (24)
- JIRKA M, KOTAS L : Occurrence of mucoproteins in human sweat : Biochim. Biophys. Acta : 1957 2 292
- JIRKA M, MASOPUST J : Immunochemical behaviour of proteins in human sweat : Biochim. Biophys. Acta 1963 71 217
- KABAT E A, MOORE D H, LANDOW H : C. S. F. electrophoresis : Proc. exp. Biol. 1942 49 260 (37)
- KABAT E A, MOORE D H, LANDOW H : Electrophoretic pattern of concentrated cerebrospinal fluid; Proc Soc. exp. Biol. 1942 21 7 571 (37)
- KAPPERS J A : Structural and functional changes in the telencephalic choroïd plexus during human autogenesis in G EW Wolstenholme and C M O' Connor (Ed) Ciba Foundation Symposium on the cerebrospinal fluid, Churchill London, 1958 3
- KARCHER D, LOWENTAL A, Van SANDE M : L'origine des protéines du liquide céphalorachidien : Clin. Chim. Acta 1958 3 76 (62)
- KARCHER D, Van SANDE M, LOWENTHAL A : Répartition des glycoprotéines dans le liquide céphalorachidien : Rev. Belg. Path. 1958 26 325
- KARCHER D, Van SANDE M, LOWENTHAL A : Micro-electrophoresis in agar-gel of proteins of the cerebrospinal fluid and central nervous system : J. neurochem : 1959 4 135 (62)
- KNAPP A : Differential diagnose zwischen gutartigen und bösartigen tumoren, sowie entzündungsprozessen des zentralnervensystem mit hilfe der papierelektrophorese des liquor cerebrospinalis : Clin. Chim. acta 1958 3 45
- KOHLER CI, MANUEL Y : Premiers résultats de l'électrophorèse des liquides céphalorachidiens prélevés au cours de pneumo-encéphalographies chez les jeunes enfants (électrophorèse sur papier immuno - électrophorèse et électrophorèse en gel d'amidon) Pédiatrie 1963 8 18 903
- KUTT H, MacDOWELL F, CHAPMAN L, PERT J : Abnormal protein fractions in cerebrospinal fluid demonstrated by starch gel electrophoresis : neurology 1960 10 1 064 (31)
- LACOUR J R : Etude comparative chez le sujet normal et fatigué de quelques aspects biochimiques de la sueur Thèse de Médecine, Lyon 1963 (54)
- LACOUR J R, MANUEL Y : Intervention des mucopolysaccharides acides dans la réaction de Donaggio C R Soc. Biol. 1963 8-9 157 1 626 (54)
- LAFON R, MONNIER P, MINVIELLE J : L'électrophorèse couplée des protides du liquide céphalorachidien et du sérum 150 observations Rev. Neurol. 1956 95 69

- LATERRE E C : Les protéines du liquide céphalorachidien à l'état normal et pathologique: Thèse d'agrégation Louvain (Belgique) Arscia (Ed) 1964 (2, 20, 22, 24, 29, 47, 48, 50, 51, 52, 56, 60, 64, 65, 66, 69, 70, 74)
- LATERRE E C, HEREMANS J F : DEMANET G : La pathologie des protéines du liquide céphalorachidien. Etude électrophorétique et immunoélectrophorétique (600 observations) Rev. Neurol. 1962 107 500
- LATERRE E C, HEREMANS J F : A note on proteins apparently "specific" for cerebrospinal fluid : Clin. Chim. Acta 1963 8 220 (29, 33, 48, 51, 70)
- LATERRE E C, HEREMANS J F, CARBONARA A O : Immunochemical comparison of some proteins found in cerebrospinal fluid, urine and extracts from brain and kidney : Clin. Chim. Acta 1964 10 197 (29, 48, 50, 51, 52, 70)
- LATERRE E C, CARBONARA A O, HEREMANS J F : Les protéines tissulaires du liquide céphalorachidien et de l'urine humaine normale in H. Peeters (Ed) Protides of the Biological fluids, Proceedings of the 12 th Colloquium Bruges, Elsevier Amsterdam, 1964 (29, 48, 51, 52, 60, 70)
- LAURENT U B G, LAURENT T C, HOWE A F : Chromatography of soluble proteins from the bovine vitreous body on DEAE cellulose : Exp. eye Res. 1962 1/3 276
- LAWTON SMITH J, DOUTY E : Electrophoresis of sub-retinal fluid : Arch. of Opt. 1960 64 114
- LECUIRE J, De ROUGEMONT J, MANUEL Y, WEBER : L'électrophorèse du liquide céphalorachidien dans l'hydrocéphalie (premiers résultats). Neurochirurgie : 1962 8 356 (66)
- LEROY E C, KAPLAN A, UDENFRIEND S, SJOERDSMA A : A hydroxyproline-containing, Collagen-like protein in plasma and a procedure for its assay ; The J ; of Biol. Chem. 1964 10 239 3 350 (72)
- LEVY G, POLONOVZSKY J : Identification d'une protéine après immunoélectrophorèse par la technique de la fente courte : Bull. Soc. Chim. Biol. 1958 9-10 40 (18)
- LOWENTHAL A : L'électrophorèse des protéines du L.C.R. en clinique humaine : Rev. Med. Univ. Libre Bruxelles 1969 4 15 101
- LOWENTHAL A : Application of electrophoresis to the study of the proteins of the central nervous system : Wld. Neurol. 1960 1 2 150
- LOWENTHAL A : Acquisitions nouvelles par l'étude électrophorétique du L.C.R. dans les affections démyélinisantes de l'Homme et de l'animal : Acta Neurol. Belg. 1962 9 62 875 (13)
- LOWENTHAL A, KARCHER D, Van SANDE M : Electrophoretic studie of central nervous system protéins : Exp. neurol. 1959 1 3 233
- LOWENTHAL A, PETRE-QUADENS O : Intérêt de l'électrophorèse en agar des protéines du L.C.R. pour l'établissement du diagnostic différentiel en neurologie : Rev. Franç. Etud. Clin. et Biol. 1963 3 8 255
- LOWENTHAL A, Van SANDE M, KARCHER D : The differential diagnostic of neurological diseases by fractionating electrophoretically the C.S.F. γ globulins : J. Neurochem. 1960 6 51 (13)
- LOWENTHAL A, Van SANDE M, KARCHER D : Enzymo-electrophorèse du L.C.R. : J. Physiol. (Paris) 1960 57 157
- LOWENTHAL A, Van SANDE M, KARCHER D : Fractionnement électrophorétique des déhydrogénases de l'acide lactique et de l'acide malique du L.C.R. et des extraits cérébraux chez l'Homme et l'animal : Pure appl. Chem. 1961 3-4 3 411
- LOWENTHAL A, KARCHER D, Van SANDE M : Mobilités relatives des γ globulines du sérum et du liquide

- MORETTI J, HARTMANN L : Recherche des correspondances entre les résultats des électrophorèse sur papier, immunoelectrophorèse en gélose et électrophorèse en gel d'amidon des protéines du sérum : Bull. Soc. Chim. Biol. 1959 41 79
- MORGAN E H ; LAURELL C B : Neuraminidase in Mammalian brain : Nature 1963 197 921
- MOULIN G, MANUEL Y : Etude immunoelectrophorétique comparative des protéines du sérum et du liquide des bulles dans les dermatoses bulleuses (60 observations) Ann. Derm. Syphil. 1964 5-6 91 505 .
- MOURAY H, MORETTI J, FINE J M : Une technique de microélectrophorèse en gel d'amidon : Bull. Soc. Clin Biol. 1961 43 993
- MUKAI A, EJIMA T : Studies on sialic acid (neuraminic acid) in cerebrospinal fluid ; Tohoku J. Exp. Med. 1962 77 343
- NAKAJIMA K : Paper electrophoresis studies of C.S.F. proteins. I Studies of normal C.S.F. protein fraction and influence of serum protein on C.S.F. protein pattern in various pathophysiologic conditions : Jap. Arch. Intern. Med. 1959 3 221
- OPPENHEIMER J H, SUKS M I, SMITH J C, SQEF R : Isolation and caractérisation of human Thyroxine - binding prealbumin : The J. of Biol. Chem. 1965 1 240 173 (42, 43)
- PARKER W C ; BEARN A G : Studies on the transferrins of adult serum, cord serum, cerebrospinal fluid. The effect of neuraminidase : J. exp. Med. 1962 115 83 (32, 44, 46, 69)
- PARKER X C, HAGSTROM J W, BEARN A G : Additional studies on the transferrins of cord serum and cerebrospinal fluid : J. exp. Med. 1963 118 975 (32, 44, 46, 69)
- PAU H : Problème électrophorétique de la seconde humeur aqueuse Doc. Opht. 1957 2 120
- PAUFIQUE L, CHARLEUX J, MANUEL Y, MOREL P, VOINOT J, DENHAUT : Le vitré humain lyophilisé : Ann. d'Oc. 1963 I 196 1
- PERT J H, KUTT H : Zone electrophoresis of cerebrospinal fluid proteins in starch gel : Proc. Soc. exp. Biol. and Med. 1958 99 181 (31, 63)
- PETTE D, STUPP I : Dit "tau" fraktion im liquor cerebrospinalis : Klin. Wschr. 1960 38 3 109 (45)
- PETTE D : Mikroelektrophorese Von liquor cerebrospinalis in agar gel : Klin. Wschr. 1958 23 1 106
- PETTE D : Untersuchungen über die spezifische und quantitative Erfassung des liquor globulins mit der Zink sulfatallung : Klin. Wschr. 1958 15 36 775
- PHILIPPART M : Intérêt diagnostique de l'électrophorèse en agar dans les cas d'hyperalbuminurie : Ann. Soc. Roy. Sci. Med. Nat. Brux. 1961 14 5
- PORATH J, FLODIN P : Gel filtration : protides of the biological fluids : 1963 10 2 90
- POSTHUMUS R G, ZONDAG H A : Papierelektrophoretische Eiweißuntersuchung des Augenkammerwassers : Klin. Monst. für Augen. 1960 3 136 380
- POULIK M D : Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers : Nature 1957 180 1 477
- POULIK M D, SMITHIES O : Comparison and combination of the starch gel and filter paper electrophoretic methods applied to human sera, two dimensional electrophoresis : Biochem. J. 1958 68 636 (7) .
- PUTNAM F M : The plasma proteins : Academic Press New-York and London 1960
- REVILLARD J P, MANUEL Y : Les protéinuries : valeur sémiologique de leur étude électrophorétique : Camu-

gli (Ed) Lyon 1965 (35, 36)

RICE E W, LOFTIS J W : Critique of the determination of proteins in cerebrospinal fluid. Evaluation of the biuret method of Goa and the T. C. A. turbidimetric method of Meulemans: Clin. Chem. 1962 8 56

RICHARD G : Communication personnelle (34, 57)

ROSENTHAL F D, and SOOTHIL J G: An Immunochemical study of the proteins in cerebrospinal fluid : J. Neurol Surg Psychiat. 1962 25 177 (25, 30, 59, 68)

ROUPERT G : L'électrophorèse des protéines du L. C. R. : Thèse imp Foulon Paris, 1956

ROYER J : Biochimie du liquide sous-rétinien dans le décollement de rétine essentiel, électrophorèse des protéines Thèse Lyon 1960

ROWE D S, SOOTHIL J F : The proteins of postural and exercise proteinuria Clin. Sci. 1961 21 87

SAIFER A, GERSTENFELD S : Photometric determination of sialic acids in serum and C. S. F. with the thio-barbituric acid method : Clin. Chim. Acta : 1962 7 467

SCHEIDEGGER J J : Une microméthode de l'immunoélectrophorèse : Internat. Arch. Allergy 1955 7 103 (11)

SCHEIFFARTH F, GOTZ H, BERG G, HOPFENBERGER H : Immunoelktrophoretische Studien am normalem und pathologischen liquor ; Klin. Wschr. 1958 14 36 679

SCHMID K, BURGI W : Preparation and properties of the human plasma Ba- α 2 glycoproteins : Biochem. Biophys. Acta 1961 47 440

SCHNEIDER G, WALLENIUS G : Electrophoretic studies on cerebrospinal fluid proteins : Scand. J. Lab. Invest. 1951 3 145

SCHULTZE H E, HEIDE K, HAUPT H : Charakterisierung eines niedermolekularen alpha 2 mukoïds aus human-serum : Naturwiss. 1962 49 15 (21, 50)

SCHULTZE H E, HEIDE K, HAUPT H : α 1 -antitrypsin aus Humanserum : Klin. Wschr. 1962 40 427 (17)

SCHULTZE H E, HEIDE K, HAUPT H : Über ein noch nicht beschriebenes α 1 glycoprotein des menschlichen Serums : Naturwiss. 1962 49 33 (17)

SCHULTZE H E, HEIDE K, HAUPT H : Über sein bisher unbekanntes saures α 2 glycoprotein : Naturwiss. 1962 49 133 (21)

SCHULTZE H E, HEIDE K, HAUPT H : Isolation of an easily precipitable α 1 glycoprotein of human serum : Nature 1963 200 1 103

SCHULTZE H E, SCHENBERGER M, SOWICK G : Über ein Präalbumine des menschlichen serums Biochem 2 : 1956 328 267 (38, 43)

SCHULTZE H E, SCHWICK G : Immunchemischer Nachweis von Protein Veränderung unter besonderer Berücksichtigung fermentativer Einwirkungen auf Gluko-U lipoproteine Immunoelktrophoretische Studien : Behringwerk Mitte : lungen 1957 1 33

SCHULTZE H E, MALHING A : On the problem of the chemical structure of plasma proteins : Bibl. Haemat 1961 12 197

SCHULTZE H E, HEIMBURGER N, FRANK G : Die Aminosäurezusammensetzung des menschlichen Präalbumins (Try) und die des Human- und Rinderserumalbumin : Biochem. Zeit : 1962 336 388 (39, 43)

- SMITHIES O : Zone electrophoresis in starch gel : group variation in the serum proteins of normal human adults : Biochem. J. 1955 61 629 (8)
- SMITHIES O : Starch gel electrophoresis : metabolism 1964 13 974 (8, 9)
- SOOTHILL J F : Estimation of eight serum proteins by a gel diffusion precipitative technique : J. Lab. Clin. Med. 1962 59 859
- SPINA-FRANCA A, AMAR I : I Valores normais da concentraçao protica do liquido cefalorraquidiano : variaçoes ligadas ao local de coljeita da amostra : Arq. Neurol. Psiquiat. (S Paulo) 1961 19 220
- STEVENSON G T : Further studies of the γ related proteins of normal urine : J. clin. Invest. 1962 41 1190 (50)
- SVENNILSON E, DENCKER S J, SWAHN E : Immunoélectrophoretic studies of cerebrospinal fluid : Neurology 1961 11 989
- SVENSMARK O : Determination of protein on cerebrospinal fluid. A comment on the Lowry method Scand. J. clin. Lab. Invest 1958 10 50
- SWAHN K : BRONNENSTAM R, DENCKER S J : On the origin of the lipoproteins in the cerebrospinal fluid : Neurology : 1961 11 437
- TISELIUS A : Electrophoresis of serum albumin : Biochem. J. 1937 31 313 (5)
- TOURTELOTTE W W, SKRENTNY B A, DEJONG R N : Etude des lipides du liquide céphalorachidien. J. of Lab. and Clin. Med. 1959 54 197
- TRINCAO M, PALHA F, GASPAR E : The proteinogram of the C.S.F. J. Soc. Ciénc. Med. Lisboa . : 1961 8 125 494
- URIEL J : Interprétation quantitative des résultats par électrophorèse et immunoélectrophorèse en gélose : in Grabar P Analyse immunoélectrophorétique. Masson et Cie Paris, (Ed) 1960(57)
- Van der HELM H J : Determination of the protein of C.S.F. by means of microélectrophoresis in agar gel : J. Nerv. Ment. Dis. 1961 13 443
- Van SANDE M : Contribution à l'étude des protéines cérébrales et de deux enzymes (la déhydrogénase de l'acide lactique et la déhydrogénase de l'acide malique) du système nerveux central : Thèse 1962 ; Ann . Soc. roy. Sci. Med. Nat. Brux. 1962 15 1 (62)
- Van SANDE M, LOWENTHAL A, KARCHER D : Intérêt clinique des électrophorégrammes du liquide céphalorachidien : Acta Belg. Neurol. 1957 57 523
- WEISE H J : Das Liquoreiweissbild bei Dys-und Paraprotéinamie : Klin. Wschr. 1960 20 38 1 040
- WEISE H J : Kritishe vergleiche swischen kammerwasser und liquor cerebrospinalis : Doc. Opht. (Adv. in OPHT) 1957 2 311
- WILLANUEVA EDO : Notre expérience en électrophorèse du liquide céphalorachidien : Rev. Clin. Esp. 1961 3 83 227
- WITTMER R : Erfahrungen mit der papier elektrophorese des pathologischen kammerwassers : Doc. Opht. (Adv. in Opht.) 1957 2 128
- WISLOCKI G B, LADMAN A L : The fine structure of the mammalian choroïd plexus in G.E.W. Wolstenholme and C.M. O' Connor (Ed), Ciba Foundation Symposium on the cerebrospinal fluid, Churchill London 1958 55
- WUNDERLY C H , CAGIANUT B : Electrophorèse de l'humeur aqueuse pathologique : Ann. d'Ocul. 1952 185 414

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

ASPECTS RECENTS DU METABOLISME DES MUCOPOLYSACCHARIDES ACIDES

Vu et approuvé :

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. BRACONNIER

Vu :

Les Membres du Jury,

M. J. CHOPIN Président

Mlle D. GAUTHERON }
M. G. BISERTE } Examineurs

Vu et accordé le permis d'imprimer :

Lyon, 21 Juin 1965

Le Recteur,

Président du Conseil de l'Université.

P. LOUIS

